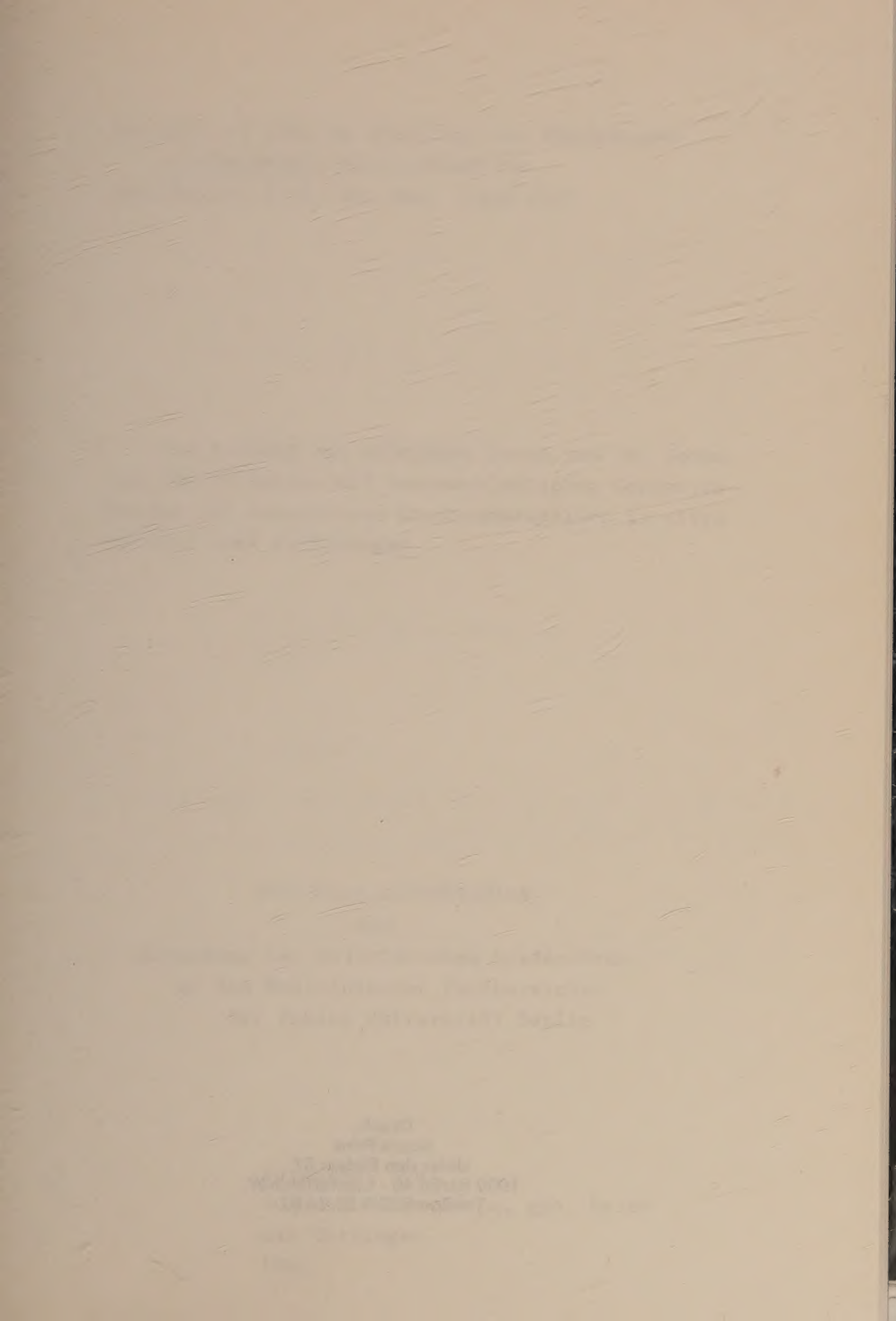


Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

**DIE WIRKUNG VON AUTOLOGEM SERUM UND
VON SERUM VON CML-PATIENTEN MIT
UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN
AUF MENSCHLICHE KNOCHENMARKZELLEN
IN VITRO WÄHREND DREI KULTURTAGEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanne Hesse-Amojo, geb. Hesse
aus Göttingen
1984



Druck:
Kopie Print
Unter den Eichen 57
1000 Berlin 45 - Lichterfelde-W.
Telefon 030/8 31 24 82

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

Die Wirkung von autologem Serum und von Serum
von CML-Patienten mit unterschiedlichen Konzentra-
tionen auf menschliche Knochenmarkzellen in vitro
während drei Kulturtagen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Susanne Hesse-Amojo, geb. Hesse
aus Göttingen

1984

Referent: Frau Prof. Dr. med. I. Boll

Korreferent: Herr Prof. Dr. med. H. Gerhartz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. 3. 1984

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
II. Material und Methode	9
III. Ergebnisse	22
IV. Zusammenfassung der Ergebnisse	50
V. Diskussion	60
VI. Zusammenfassung der Arbeit	65
VII. Literaturverzeichnis	67

I. Einleitung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist charakterisiert durch eine hochgradige Vermehrung der granulozytären Vorstufen im Knochenmark, in den extramedullären Blutbildungsherden (Leber, Milz) und im Blut (1, 13, 58, 59). Ein weiteres Kriterium ist das Auftreten eines Philadelphia - (Ph^1) - Chromosom 22 in 85 % der Fälle, dessen diagnostische Bedeutung nicht bestritten wird, über dessen konkrete pathogenetische Funktion man jedoch im Unklaren ist (36). Die Pathogenese der CML ist bis heute nicht geklärt.

Vieles spricht dafür, daß Störungen der humoralen Regulation der Granulopoese eine wichtige Rolle spielen. Offen bleibt, ob die beobachteten Konzentrations- und Aktivitätsänderungen der humoralen Regulationsfaktoren primär die für die CML typischen Veränderungen des Zellbildes bewirken, oder ob durch genetische oder exogene Noxen veränderte Zellpopulationen sekundär die Synthese und Wirksamkeit einzelner Regulationsfaktoren beeinflussen.

1. Die Regulationsfaktoren

Die Differenzierung und Proliferation von Knochenmarkszellen unter geeigneten Kulturbedingungen ist nur in Anwesenheit mehrerer humoraler Faktoren möglich. Es handelt sich um Glykoproteine, deren chemische Struktur noch unbekannt ist.

Sie werden deshalb als "colony stimulating activity" (CSA) bzw. als "colony stimulating factor" (CSF) umschrieben (17, 20, 23, 24, 25, 28, 32, 44, 51, 60, 68).

CSA kommt in allen Geweben vor, wird aber wahrscheinlich nur von reifen Monozyten und Makrophagen gebildet (21, 41, 45, 48, 57, 65). Sie wird über die Nieren ausgeschieden und ist im Urin nachweisbar. Die Zielzelle der CSA scheint die determinierte, granulopoetische Stammzelle zu sein (30, 32, 43). Der determinierten Stammzelle des englischen Schrifttums (committed stemcell) entspricht in der deutschsprachigen Literatur eine Vorstufe des Myeloblasten, die von diesem morphologisch nicht sicher unterschieden werden kann.

Funktionell unterscheidet sie sich jedoch vom Myeloblasten dadurch, daß sie sowohl wie der Myeloblast zum Granulozyten ausdifferenzieren, als auch in die monozytäre Entwicklungsreihe eintreten kann. In Anwesenheit von CSA treten ruhende Zellen in der Zellzyklus ein, die Zellzykluszeit wird verkürzt und die RNA-Synthese wird gesteigert (42, 45). Die Wirkung auf die Differenzierung ist konzentrationsabhängig: Hohe CSA-Spiegel begünstigen die Ausdifferenzierung zu Granulozyten. Dagegen induzieren niedrige CSA-Spiegel die vermehrte Ausreifung von Monozyten und Makrophagen. Im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus erhöhen diese dann wieder die CSA-Konzentration (19, 46).

Es liegt nahe, Bildung und Wirkung von CSA mit dem die Erythropoese stimulierenden Erythropoetin zu vergleichen (7, 11, 12, 16). Obwohl noch viele Details unbekannt sind, ist davon auszugehen, daß die Regulation der Granulopoese wesentlich komplexeren und differenzierteren Mechanismen unterworfen ist.

Dies bestätigt sich auch bei der Analyse des Systems der die Granulopoese hemmenden Faktoren. Man unterscheidet unspezifische und spezifische Inhibitoren. Zu den unspezifischen Inhibitoren gehören unter anderem hitzelabile Serum-Lipoproteine und Prostaglandin E aus Makrophagen. Beide hemmen die Koloniebildung in vitro (45). Die spezifischen Inhibitoren werden auch als Chalone bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1916 von Schäfer geprägt und von Bullough 1965 eingeführt. Chalone sind gewebsspezifische, nicht speziesspezifische Faktoren, die eine reversible, nicht zytotoxische Hemmung der Proliferation bewirken. Sie werden von neutrophilen Granulozyten gebildet, deren Chalongehalt positiv mit dem Reifegrad korreliert (40, 69). Während Metcalf (46) und Rytömaa und Kiviniemi (61) das Granulozyten-Chalon als Inhibitor mit niedrigem Molekulargewicht beschreiben, identifiziert Paukovits (53-55) ein Polypeptid als Chalon. Übereinstimmung herrscht darüber, daß die Chalone im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die CSA antagonisieren (19, 30, 46, 64). Als Zielzelle wird ebenfalls die determinierte

granulopoetische Stammzelle betrachtet.

2. Die Regulation der Granulopoese bei der CML

Schon 1966 stellte Boll (6) fest, daß bei der CML die Proliferationsfähigkeit der granulozytären Vorstufen vermindert ist. Die Mitoseindices sind verringert und die Ausreifungszeit ist verlängert (8). Die Überfüllung des Knochenmarks ist demnach durch die verlängerte Verweildauer zu erklären. Der Zusatz von gefrorenem und aufgetautem Serum von CML-Patienten zu normalen Knochenmarkkulturen bewirkt jedoch eine Steigerung der Regeneration (17). Die Zelldifferenzierung wird nicht stimuliert.

Broxmeyer (19) findet ebenfalls erhöhte CSA-Konzentrationen bei an chronisch myeloischer Leukämie Erkrankten, und zwar unabhängig vom Zustand der Patienten und der Art der Therapie. Boll (14) und Metcalf (45) bestätigen, daß die Chemotherapie keinen Einfluß auf die CS-Aktivität hat.

Gleichzeitig beobachtet Broxmeyer eine verminderte Ansprechbarkeit der CML-Zielzellen auf den von normalen Granulozyten gebildeten Inhibitor. Nur durch Erhöhung der Konzentration kann die gleiche Inhibitorwirkung erzielt werden.

Metcalf (45) beobachtet bei CML normale Inhibitorkonzentrationen, die aber keine entsprechende Hemmwirkung auf CML-Zellen haben. Die CSF-Konzentration ist gleichzeitig erhöht. Trotzdem ist die Zellzykluszeit der CML-Zellen verlängert (43). Außerdem weist Metcalf (42, 45) nach, daß auch CML-Knochenmarkkulturen nur in Anwesenheit von CSF proliferieren können, also nicht autonom sind.

Dagegen vermutet Forrer (29), daß bei CML die Kolonie stimulierende Aktivität (CSA) erniedrigt ist. Er beobachtet ebenfalls eine verlängerte Zellzykluszeit, die außerdem stark schwankt und eine verzögerte Reifung, die die Persistenz unreifer, teilungsfähiger Zellen bedingt.

Fibach und Sachs (27) gelingt es, myeloische Zellen, gewonnen von Mäusezellkulturen, zur Ausreifung zu bringen, indem sie konditioniertes Medium, bestehend aus Lungenzellkulturen von mit Endotoxin vorbehandelten Mäusen, zusetzen.

Sachs (63) und Golde (34, 35) postulieren, daß ein Mangel an CSF die Ausreifungsstörung verursacht. Ferner beobachtet Sachs, daß CML-Zellen in vitro auch in Abwesenheit von CSF proliferieren können, wobei aber eine Differenzierung und Ausreifung nicht eintritt.

Böyum (4) findet eine abgeschwächte Inhibitorwirkung bei CML. Er vermutet, daß die unreifen CML-Granulozytenvorstufen nicht in der Lage sind, ausreichende Mengen an Chalonen zu synthetisieren. Somit überwiegen die Faktoren, die die Regeneration stimulieren. Auch andere Autoren bestätigen ein Versagen des negativen Feedback-Mechanismus (3, 38, 52, 56). Dagegen beobachten Stryckmans (66, 67), Moberg (47) und Rytömaa (61, 62) eine normale Hemmwirkung der leukämischen Granulozyten auf die Regeneration im Stadium der Remission.

3. Fragestellung

Die teils übereinstimmenden, teils entgegengesetzten Untersuchungsergebnisse erschweren die Interpretation der bis heute gewonnenen Erkenntnisse über die Regulationsstörungen der Granulopoese bei der chronischen myeloischen Leukämie. Außerdem muß man berücksichtigen, daß kein einheitliches Zellmaterial verwendet wurde. Während sich einige Forscher auf menschliche Knochenmarkproben und Serumzusätze beschränken, verwenden viele Untersucher entweder Mäuse-Knochenmarkkulturen mit menschlichen CML-Serumzusätzen oder gewinnen die Serumzusätze von an Leukämie erkrankten Mäusen und anderen Tieren. Die Beurteilung der so erzielten Kulturergebnisse ist problematisch. Lind (37) stellt fest, daß es weder eine quantitative, noch eine qualitative Übereinstimmung in der Reaktion auf humane Serumstimulationsfaktoren zwischen menschlichen Knochenmarkkulturen und Mäuse-Knochenmarkkulturen gibt. Auch Metcalf (45) räumt ein, daß Mäuse-Knochenmarkkulturen zum Teil nicht auf bei menschlichen Kulturen sicher stimulierend wirkende Serumfaktoren reagieren. Er vermutet, daß beim Menschen die Regulation der Granulopoese wesentlich komplexer ist und mehrere synergistisch wirkende Faktoren umfaßt.

Ein weiterer Störfaktor sind die unterschiedlichen Kulturmethoden. Viele der älteren Forschungsarbeiten basieren auf Versuchen mit Agar- oder Koagulumkulturen (5, 9, 10, 49). In letzter Zeit setzt sich aber immer mehr die Technik der Flüssig-bzw. Suspensionskultur durch (17, 18, 22, 26, 33, 35). Beim Vergleich der Ergebnisse muß man die Besonderheiten der jeweils angewendeten Kulturmethode berücksichtigen. In der Agarkultur ist der für die Proliferation wichtige Zell zu Zell-Kontakt nicht möglich (23). Auch ein vorzeitiges Absterben der Zellen wird auf die Kulturbedingungen im Agar zurückgeführt (45). Morley (50) betont, daß die nur in der Suspensionskultur mögliche genaue morphologische Präparation erst eine Unterscheidung der grob morphologisch unauffälligen (Metcalf) CML-Zellen von normalen Zellen erlaubt. Forrer (29) stellt fest, daß die CML-Zellen generell in vitro stärker ausdifferenzieren als in vivo.

Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden durchgeführt, um folgendes zu prüfen:

1. Welchen Einfluß hat die angewendete Kulturmethode?

Vergleich der an Suspensionskulturen gewonnenen Ergebnisse mit den von Boll 1968/69 (7, 8) an Koagulumkulturen gewonnenen Ergebnissen.

2. Führt die Änderung der Konzentration der Serumzusätze zu anderen Kulturergebnissen?

Vergleich der Wirkung von 40% frischem Eigenserum bzw. 40% gefrorenem und aufgetautem CML-Serum mit der Wirkung von 100% frischem Eigenserum bzw. 100% gefrorenem und aufgetautem CML-Serum.

3. Welche Wirkung hat der Zusatz von Serum von an chronisch myeloischer Leukämie Erkrankten auf die Proliferation normaler Knochenmarkzellen während drei Kulturtagen?

4. Vergleich der Wirkung von gefrorenen und aufgetauten CML-Serumzusätzen mit der Wirkung von frischen autologen Serumzusätzen auf die Proliferation normaler Knochenmarkzellen während drei Kulturtagen.

II. Material und Methode

Zur Durchführung der Versuche wurden Sternalpunktate von fünf Patienten mit weitgehend unauffälligem Knochenmark verwendet. Zwei Patienten (Versuch IV und V) zeigten im peripheren Blutbild eine Anämie, worauf später noch einmal eingegangen wird.

Von jeder Knochenmarkprobe wurde durch verschiedene Serumzusätze eine Versuchsreihe angelegt, die jeweils vier Kulturserien umfaßte:

1. Sternalpunktat + 40% frisches Eigenserum des Knochenmarkspenders.
2. Sternalpunktat + 100% frisches Eigenserum des Knochenmarkspenders.
3. Sternalpunktat + 40% CML-Serum (gefroren und aufgetaut).
4. Sternalpunktat + 100% CML-Serum (gefroren und aufgetaut).

Versuch I und II wurden mit dem Serum A einer seit sechs Jahren mit Busulfan gut eingestellten chronisch myeloischen Leukämie angesetzt.

Für Versuch III wurde das Serum B einer noch nicht behandelten CML verwendet.

Die Kulturen der Versuche IV und V mit CML-Serumzusätzen wiesen nur wenige, meist degenerierte Zellen auf und konnten nicht ausgewertet werden. Sie waren beide mit dem Serum C einer seit einem halben Jahr erkrankten Patientin angesetzt worden, die trotz Behandlung mit Busulfan und Glukokorticoiden (siehe S. 16) eine hohe Leukozytose, eine ausgeprägte Anämie und Thrombozytopenie mit entsprechenden Veränderungen des Knochenmarks aufwies.

Methode der Kultivierung

Suspensionskultur:

Nach Aspiration in heparinhaltiger Hank's-Lösung (5-10 E/ml, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 48232, USA) wurde jeweils ein Teil des Sternalpunktates zur Anfertigung eines Originalpräparates auf einem Objektglas ausgestrichen und

nach Pappenheim gefärbt. Dieses Originalpräparat liefert die Ausgangswerte zur Beurteilung der während der Kultivierung mit Serumzusätzen auftretenden Veränderungen.

Gleichzeitig wurde das übrige Knochenmark nach einer von Boll 1975 (14) entwickelten Technik kultiviert. Bei diesem als Suspensionskultur bezeichneten Verfahren werden die aspirierten Markbröckel in RPMI-Medium 1640 (Gibco/Biocult, 3 Washington Road, Paisley PA 34 EP Scotland) gebracht und durch mehrmalige Passagen durch Kanülen abnehmenden Kalibers homogenisiert. Die Suspension wird zentrifugiert und der fetthaltige Überstand verworfen.

Folgende Kulturen wurden angesetzt:

1. 40% Eigenserum-Ansatz:

1,8 ml Zellsuspension in RPMI mit 200 mg% Glukose
1,2 ml Eigenserum (= 40%)
auf 1 ml Zellsuspension 11,6 μ g Ampicillin und 2,4 μ g Streptomycin.

2. 100% Eigenserum-Ansatz:

Zellsediment
3 ml Eigenserum (= 100%)
auf 1 ml Zellsuspension 11,6 μ g Ampicillin und 2,4 μ g Streptomycin.

3. 40% CML-Serum-Ansatz:

1,8 ml Zellsuspension in RPMI mit 200 mg% Glukose
1,2 ml CML-Serum (= 40%)
auf 1 ml Zellsuspension 11,6 μ g Ampicillin und 2,4 μ g Streptomycin.

4. 100% CML-Serum-Ansatz:

Zellsediment
3 ml CML-Serum (= 100%)
auf 1 ml Zellsuspension 11,6 μ g Ampicillin und 2,4 μ g Streptomycin.

Die so angesetzten Kulturen wurden jeweils in einem luftdicht verschlossenen 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 37°C inkubiert. Abgesehen von der sterilen Entnahme von Proben nach

24 und 72 Stunden blieben sie unberührt.

Die Eigenserumzusätze wurden zum Zeitpunkt der Sternalpunktion gewonnen. Die CML-Seren waren bei -20 C im Kühlschrank gelagert worden.

Auswertung

Nach 24 und 72 Stunden wurde von jeder Kultur eine Stichprobe entnommen, von der jeweils drei Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt wurden. Die Ausstriche wurden meanderförmig gemustert und die Differenzierung erfolgte vorzugsweise aus den aufgelockerten Randgebieten der am besten zu beurteilenden Ausstriche. Pro Stichprobe wurden 2000 Zellen unter Berücksichtigung der auftretenden Mitosen und Bestimmung der Mitosephase nach den von Boll (6, 13, 15) beschriebenen Kriterien differenziert, Somit wurden insgesamt 72910 Zellen mit 640 Mitosen gezählt.

Folgende Zellen wurden unterschieden:

In der Granulopoese:

Myeloblast	(Mb)
Promyelozyt	(Pm)
Myelozyt	(My)
eosinophiler Myelozyt	(eo My)
basophiler Myelozyt	(ba My)
Jugendlicher Myelozyt	(Ju)
Promonozyt	(PMo)
stabkerniger Granulozyt	(Stab)
neutrophiler segmentkerniger Granulozyt	(Seg)
eosinophiler segmentkerniger Granulozyt	(eo Seg)
basophiler segmentkerniger Granulozyt	(ba Seg)
Monozyt	(Mo)

Alle Vorstufen vom Myeloblasten bis einschließlich jungem Myelozyten werden als teilungsfähig angesehen; Boll (13).

In der Erythropoese:

Proerythroblast	(Pe)
basophiler Erythroblast	(bE)
polychromatischer Erythroblast	(pE)
oxyphiler Erythroblast	(oE)
reifer Erythroblast	(rE)

Alle erythropoetischen Vorstufen, mit Ausnahme des reifen Erythroblasten, werden als teilungsfähig angesehen (13).

Ferner wurde differenziert in:

große Retikulumzelle
kleine Retikulumzelle
phagozytierende Retikulumzelle
Plasmoblast
Plasmazelle
Megakaryoblast
Megakaryozyt
Lymphoblast
Lymphozyt

Die Unterscheidung der Mitosephasen erfolgte nach den von Boll (13) dargelegten morphologischen Kriterien in:

Prophase
Frühe Metaphase
Späte Metaphase
Anaphase
Telophase
Rekonstruktionsphase

Morphologische Besonderheiten der einzelnen Ausstriche, wie z.B. Kern-Zytoplasmareifungsdissoziation, Megaloblastose etc. wurden ebenfalls notiert.

Basierend auf den Zählergebnissen wurden folgende Größen der Proliferationskinetik bestimmt:

1. Mitoseindex

Er wird getrennt für Granuloblasten (wMI) und Erythroblasten (rMI) aus der Anzahl der beobachteten Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen errechnet und in Promille angegeben.

2. Reifungskurven

Getrennt nach Granulopoese und Erythropoese wird der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsstufen errechnet und additiv pro Zeiteinheit aufgetragen. Um eine bessere Übersicht zu erreichen, werden in den Reifungskurven der Granulopoese folgende Zellen zusammengefaßt: Eosinophile und basophile Myelozyten werden den neutrophilen Myelozyten zugerechnet, eosinophile und basophile segmentkernige Granulozyten sind im Anteil der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten enthalten. Promonozyten und Monozyten, die beide jeweils nur einen Anteil von wenigen Prozent haben, werden nicht mit addiert, erscheinen also nicht in den Reifungskurven.

3. G/E-Index

Er stellt das Verhältnis aller Zellen der Granulopoese zur Erythropoese dar.

4. Signifikanzberechnung

Die Mitoseindices werden unter Anwendung des PEARSON-Tests nach dem χ^2 -Verfahren auf ihre Signifikanz hin überprüft. Eine Änderung des Mitoseindex einer Stichprobe ist dann signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit (probability = p), daß die Nullhypothese verworfen werden kann, kleiner als 0,01 ist. Nach der Formel $\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$ wird χ^2 berechnet (siehe S. 25). Der χ^2 entsprechende p-Wert wird bei einem durch unsere Versuchsanordnung bedingtem Freiheitsgrad von 1 aus mathematischen Tafeln abgelesen (2, 31). Ist $p < 0,005$, so ist der Unterschied hoch signifikant. Ist $p < 0,01$, so ist der Unterschied zweifelhaft signifikant. Bei einem $p\text{-Wert} > 0,01$ muß der beobachtete Unterschied als rein zufällig betrachtet werden.

5. Standardabweichung

Die Standardabweichung der mittleren Mitoseindices wird nach

der Formel $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ berechnet und in

den entsprechenden Kurven eingezeichnet.

Folgende Patienten spendeten die CML-Seren:

CML-Serum A: Waltraud M., geb.: 29. 7. 1948

Klin. Diagnose: Chronische myeloische Leukämie, bekannt seit dem 24. 10. 1975

Blutbild: 20. 1. 1981

Leukozyten: 10,1 x 10³/μl

Erythrozyten: 4,61 x 10⁶/μl

Hb: 13,1 g%

Hb_E: 28,2 pg

Thrombozyten: 475000/μl

Basophile: 2%

Eosinophile: 2%

Myeloblasten: 1%

Promyelozyten: 1%

Myelozyten: 1%

Metamyelozyten: 1%

Stabkernige: 3%

Segmentkernige 68%

Lymphozyten: 18%

Monozyten: 3%

BSG: 33/64

Alkalische Leukozytenphosphatase: 0 (1975)

Sternalpunktat vom 20. 10 1975:

Ausstrich zellreich, fettarm.

Granulopoese vermehrt, vorwiegend Promyelozyten, Myelozyten, Jugendliche, Stabkernige, Segmentkernige. Zahlreiche Riesenzellen. Eosinophile, Promonozyten und Monozyten vermehrt.

Erythropoese stark vermindert, nicht verschoben, normoblastisch. Keine Eisenspeicherung. Thrombopoese mit reichlich Megakaryozyten in allen Reifestufen, Mikrokaryozyten.

Medikamentöse Therapie: Busulfan seit 24. 10 1975

z. Zp. d. Serumentnahme: 20. 1. 1981: 6 x 2 mg/ Woche

CML-Serum B: Hugo A., geb.: 10. 2. 1918

Klin. Diagnose: Chronische myeloische Leukämie, bekannt seit dem 20. 2. 1981, Philadelphia Chromosom positiv.

Hyperlipämie

Blutbild: 3. 3. 1981

Leukozyten: $10,3 \times 10^3 / \mu\text{l}$

Erythrozyten: $4,96 \times 10^6 / \mu\text{l}$

Hb: 15,7 g%

Hb_E: 30,6 pg

Thrombozyten: 239000 / μl

Basophile: 2%

Eosinophile: 2%

Myelozyten: 23%

Myeloblasten: 1%

Promyelozyten 12%

Jugendliche: 9%

Stabkernige: 24%

Segmentkernige: 21%

Lymphozyten: 4%

Monozyten: 1%

Promonozyten: 1%

Alkalische Leukozytenphosphatase: 16

Sternalpunktat vom 13. 2. 1981:

Granulopoese vermehrt, linksverschoben, Eosinophile vermehrt.

Erythropoese normal, nicht verschoben, normoblastisch.

Thrombopoese mit reichlich Megakaryozyten in allen Reifestufen, Mikrokaryozyten.

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Serumentnahme: 3. 3. 1981:
Keine

CML-Serum C: Hildegard N., geb.: 22. 8. 1918

Klin. Diagnose: Chronische myeloische Leukämie, bekannt
seit dem 1. 10. 1980, Philadelphia Chromosom negativ.

Hämolyse

Rez. Otitis media li., Sinusitis li.

Blutbild: 4. 2. 1981

Leukozyten: $21,8 \times 10^3 / \mu\text{l}$

Erythrozyten: $2,16 \times 10^6 / \mu\text{l}$

Hb: 6,7 g%

Hb_E: 29,4 pg

Thrombozyten: 41000/ μl

Basophile: -

Eosinophile: -

Myeloblasten: 2%

Promyelozyten: 9%

Myelozyten: 24%

Metamyelozyten: 15%

Stabkernige: 11%

Segmentkernige: 22%

Lymphozyten: 1%

Monozyten: 3%

Promonozyten: 12%

AMZ: 1%

BSG: 55/130

Alkalische Leukozytenphosphatase: 0

Sternalpunktat vom 30. 2. 1981:

Ausstrich zellreich

Granulopoese vermehrt, linksverschoben, vorwiegend Myeloblasten, Promyelozyten und Jugendliche.

Erythropoese stark vermindert, reichlich Eisenspeicherung in Histozyten

Thrombopoese: keine Megakaryopoese

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Serumentnahme: 4. 2. 1981

Urbason 100 mg/die, fallende Dosis

2 Erysedimente/ Woche.

Folgende Patienten spendeten das Knochenmark:

Versuch 1: Hildegard G., geb.: 29. 5. 1908

Klin. Diagnose: tiefe Beinvenenthrombose

Cholezystolithiasis

Epilepsie

Blutbild: 3. 12. 1980

Leukozyten: $10,9 \times 10^3 / \mu\text{l}$

Erythrozyten: $3,7 \times 10^6 / \mu\text{l}$

Hb: 11,3 g%

Hb_E: 30,7 pg

Hk: 35,0 %

MCV: 95 μ^3

Thrombozyten: 502000 / μl

Sternalpunktat vom 19. 12. 1980:

Ausstrich zellreich, mittlerer Fettgehalt.

Granulopoese vermehrt, nicht verschoben, Mitosen vorhanden.

Erythropoese vermehrt, linksverschoben, Mitosen reichlich, normoblastisch, Megaloblastoide vorhanden.

Thrombopoese: in allen Reifestufen Megakaryozyten vorhanden.

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Sternalpunktion:

Neurocil^R 25 mg/ die

Mylepsin^R 750 mg/ die

Versuch II: Kurt M., geb.: 28. 12. 1928

Klin. Diagnose: Hypertonie
Tumorausschluß

Blutbild: 19. 1. 1981

Leukozyten:	10,5 x 10 ³ /μl
Erythrozyten:	4,76 x 10 ⁶ /μl
Hb:	14.4 g%
Hb _E :	30,3 pg
Stabkernige:	2%
Segmentkernige:	68%
Eosinophile:	3%
Lymphozyten:	24%
Monozyten:	3%
BSG:	81/120

Sternalpunktat vom 19. 1. 1981:

Granulopoese linksverschoben, Eosinophile wenig vermehrt,
Monoblasten, Promonozyten und Monozyten normal.

Erythropoese normoblastisch, Eisenspeicherung in Histio-
zyten reichlich, wenig Sideroblasten und Siderozyten.

Thrombopoese vorhanden.

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Sternalpunktion:

Dytide H^R 1 x 1 Tbl/ die

Adumbran^R 1 x 1 Tbl/ die

Versuch III: Karl-Heinz O., geb.: 26. 10 1936

Klin. Diagnose: Cholezystolithiasis
Fettleber
cerebrales Krampfleiden
LWS-Beschwerden

Blutbild: 17. 3. 1981

Leukozyten:	10,3 x 10 ³ /μl
Erythrozyten:	4,8 x 10 ⁶ /μl
Hb:	16,1 g%
Hb _E :	32 pg
Hk:	46 %
MCV:	94 u ³
Basophile:	-
Eosinophile:	1%
Myeloblasten:	-
Promyelozyten:	1%
Myelozyten:	1%
Metamyelozyten:	-
Stabkernige:	1%
Segmentkernige:	54%
Lymphozyten:	34%
Monozyten:	8%

Sternalpunktat vom 17. 3. 1981:

Ausstrich zellreich

Granulopoese nicht verschoben, reichlich Mitosen.

Eosinophile wenig vermehrt.

Erythropoese mit reichlich Mitosen, Normoblasten.

Thrombopoese mit Megakaryoblasten und reichlich
Megakaryozyten in allen Reifestufen.

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Sternalpunktion:
Allopurinol 1 x 300 mg/ die

Versuch IV: Hildegard A., geb.: 29. 8. 1927

Klin. Diagnose: Hypokaliämie bei Diarrhoe
Zust. nach Collum. Ca. Stad. I
Leukopenie, Anämie

Blutbild: 25. 2. 1981

Leukozyten:	$3,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$
Erythrozyten:	$3,1 \times 10^6 / \mu\text{l}$
Hb:	10,6 g%
Hb _E :	33,1 pg
Stabkernige:	7%
Segmentkernige:	37%
Eosinophile:	3%
Lymphozyten:	44%
Monozyten:	8%
AMZ:	1%
BSG:	40/80

Sternalpunktat vom 25. 2. 1981:

Ausstrich zellreich.

Die Proliferation aller drei hämatopoetischen Reihen ist gesteigert. Reichlich Mikrokaryozyten, läßt an myeloproliferatives Syndrom denken.

Sternalpunktat vom 5. 3. 1981:

Normales Knochenmark!

Medikamentöse Therapie z. Zp. d. Sternalpunktion:

Kalinor Brausetbl.^R 2 x 1 Tbl./ die

Lanitop^R 2 x 1 Tbl./ die

Berotec^R-Inhalationen

Heparin s. c. 3 x 5000 IE/ die

Versuch V: Nahide K., geb.: 6. 1. 1937

Klin. Diagnose: Anämie bei hochgradiger erosiver Gastritis,
Zustand nach Billroth II-Operation.

Blutbild: 10. 4. 1981

Leukozyten: 4,9 x 10³/μl

Erythrozyten: 3,4 x 10⁶/μl

Hb: 7,2 g%

Hb_E: 21,1 pg

MCV: 70 u³

Retikulozyten: 17000/μl

Sternalpunktat vom 13. 4. 1981

Ausstrich zellreich.

Granulopoese wenig linksverschoben.

Erythropoese linksverschoben, Mitosen reichlich vorhanden,
vermehrt Hämocytoblasten, Mikroerythroblasten.

Thrombopoese normal.

Medikamentöse Therapie z. Ep. d. Sternalpunktion:

Maaloxan^R 3 x 1 EBL./ die

Ferrelcit^R 1 Amp. i.v./ die

III. Ergebnisse:

Erklärung der in den folgenden Tabellen und Abbildungen verwendeten Abkürzungen:

- 40% ES: Kultur mit Zusatz von 40% Eigenserum
- 100% ES: Kultur mit Zusatz von 100% Eigenserum
- 40% CML: Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum
- 100% CML: Kultur mit Zusatz von 100% CML-Serum
- h: Kulturdauer in Stunden

Erklärung der in den Reifungskurven verwendeten Abkürzungen:

Ordinate: Kulturdauer in Stunden

Abszisse: Prozentzahlen der aufgeführten Zellen

- 40% CML-S. A-Zusatz: Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum A
- 100% CML-S. B-Zusatz: Kultur mit Zusatz von 100% CML-Serum B

Erklärung der bei der Signifikanzberechnung der Granuloblasten- bzw. Erythroblastenmitosen verwendeten Abkürzungen:

- B_M : Beobachtungswert der Mitosen
- B_N : Beobachtungswert der Nicht-Mitosen
- E_M : Erwartungswert der Mitosen
- E_N : Erwartungswert der Nicht-Mitosen
- B_{M+N} : Anzahl der beobachteten teilungsfähigen Zellen
- χ^2 : Ergebnis der Signifikanzberechnung
- p: Wahrscheinlichkeitswert
- MI: Mitoseindex

Tabelle 1: Mitoseindizes der Granulopoese in Promille

Versuch	O h	24 h					72 h				
		40 ES	100 ES	40 CML	100 CML	40 ES	100 ES	40 CML	100 CML	40 CML	100 CML
I	$\frac{2}{544} = 3,6$	$\frac{2}{581} = 15,5$	$\frac{2}{573} = 15,7$	$\frac{18}{605} = 29,7$	$\frac{7}{476} = 14,7$	$\frac{6}{673} = 8,8$	$\frac{16}{651} = 24,5$	$\frac{16}{703} = 22,7$	$\frac{13}{581} = 22,3$		
II	$\frac{8}{710} = 11,3$	$\frac{10}{362} = 10,4$	$\frac{11}{536} = 20,5$	$\frac{9}{1041} = 8,6$	$\frac{12}{1053} = 11,3$	$\frac{8}{1193} = 6,7$	$\frac{6}{1017} = 5,9$	$\frac{10}{720} = 15,3$	$\frac{10}{1037} = 9,6$		
III	$\frac{1}{609} = 1,6$	$\frac{4}{473} = 8,4$	$\frac{11}{656} = 16,7$	$\frac{16}{1257} = 12,7$	$\frac{14}{1250} = 11,2$	$\frac{14}{829} = 16,8$	$\frac{9}{957} = 9,4$	$\frac{27}{1018} = 26,5$	$\frac{11}{313} = 12,1$		
IV	$\frac{14}{697} = 20,1$	$\frac{15}{630} = 21,7$	$\frac{14}{703} = 19,9$			$\frac{21}{619} = 33,9$	$\frac{9}{572} = 17,7$				
V	$\frac{1}{467} = 2,1$	$\frac{15}{630} = 9,8$	$\frac{12}{728} = 16,5$			$\frac{25}{1012} = 24,7$	$\frac{5}{964} = 5,2$				

Mittelwerte der Mitoseindizes der Granulopoese in Promille

n=5	$\frac{26}{3027}=8,6$	$\frac{44}{3314}=13,3$	$\frac{57}{3196}=17,8$	$\frac{74}{4332}=17,1$	$\frac{45}{4161}=10,8$			
n=3	$\frac{11}{1863}=5,9$	$\frac{23}{2016}=11,4$	$\frac{31}{1765}=17,6$	$\frac{43}{2903}=14,8$	$\frac{28}{2701}=10,4$	$\frac{31}{2625}=11,8$	$\frac{54}{2441}=22,1$	$\frac{34}{2531}=13,4$
n=2	$\frac{15}{1164}=12,9$	$\frac{21}{1298}=16,2$	$\frac{26}{1431}=18,2$	$\frac{46}{1631}=28,2$	$\frac{14}{1536}=9,1$			

Tabelle 2: Zeichenerklärung: n=5: Versuch I - V

n=3: Versuch I, II, III

n=2: Versuch IV, V

Tabelle 3: Mitoseindices der Erythropoese in Promille

Versuch	24 h						72 h		
	0 h	40 ES	100 ES	40 CML	100 CML	40 ES	40 CML	100 ES	100 CML
I	$\frac{3}{620}=4,8$	$\frac{4}{434}=9,2$	$\frac{20}{441}=45,4$	$\frac{7}{381}=18,4$	$\frac{9}{433}=20,7$	$\frac{1}{101}=9,9$	$\frac{1}{73}=13,6$	$\frac{4}{70}=57,2$	$\frac{1}{75}=13,3$
II	$\frac{8}{301}=26,6$	$\frac{7}{451}=15,5$	$\frac{18}{461}=39,1$	$\frac{8}{322}=24,8$	$\frac{4}{319}=12,5$	$\frac{2}{57}=35,1$	$\frac{0}{33}=0$	$\frac{2}{32}=62,5$	$\frac{0}{8}=0$
III	$\frac{14}{360}=16,3$	$\frac{10}{493}=20,3$	$\frac{17}{302}=21,2$	$\frac{1}{134}=7,4$	$\frac{0}{65}=0$	$\frac{4}{268}=14,9$	$\frac{0}{17}=0$	$\frac{3}{151}=19,8$	$\frac{0}{40}=0$
IV	$\frac{10}{488}=20,5$	$\frac{20}{750}=26,7$	$\frac{11}{482}=22,8$			$\frac{7}{232}=30,2$		$\frac{1}{65}=15,4$	
V	$\frac{8}{626}=12,7$	$\frac{9}{507}=17,7$	$\frac{10}{536}=18,6$			$\frac{3}{148}=20,2$		$\frac{3}{272}=11,0$	

Mittelwerte der Mitoseindices der Erythropoese in Promille

n=5	$\frac{43}{2595}=14,8$	$\frac{50}{2635}=19,0$	$\frac{76}{2722}=27,9$	$\frac{17}{806}=21,1$	$\frac{13}{590}=22,1$
n=3	$\frac{25}{1781}=14,0$	$\frac{21}{1378}=15,2$	$\frac{55}{1704}=32,3$	$\frac{16}{837}=19,1$	$\frac{13}{817}=15,9$
n=2	$\frac{18}{1114}=16,2$	$\frac{29}{1257}=23,1$	$\frac{21}{1018}=20,6$	$\frac{10}{380}=26,3$	$\frac{4}{337}=11,9$
				$\frac{1}{123}=8,1$	$\frac{1}{123}=8,1$

Tabelle 4: Zeichenerklärung: n=5: Versuch I - V

n=3: Versuch I, II, III

n=2: Versuch IV, V

Beispiel der Signifikanzberechnung: rMI; 24 h; n=5:

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
40% ES	50	2585	2635	62,0	2573
100% ES	76	2646	2722	64,0	2658
Summe	126		5357		

$$40\% \text{ ES} \quad E_M = \frac{126 \times 2635}{5357} = 62,0$$

$$E_N = 2635 - 62 = 2573$$

$$100\% \text{ ES} \quad E_M = \frac{126 \times 2722}{5357} = 64,0$$

$$E_N = 2722 - 64 = 2658$$

$$\frac{B_M - E_M}{E_M}^2 \quad \frac{B_N - E_N}{E_N}^2$$

$$40\% \text{ ES} \quad \frac{(12)^2}{62} = 2,32 \quad \frac{(12)^2}{2573} = 0,056$$

$$100\% \text{ ES} \quad \frac{(12)^2}{64} = 2,25 \quad \frac{(12)^2}{2658} = 0,054$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E} = 4,683$$

$\chi^2 = 4,683$ entspricht bei einem Freiheitsgrad von 1
 $p = 0,03$ und ist damit zweifelhaft signifikant.

Zeichenerklärung siehe Seite 22.

Tabelle 5: Signifikanzberechnung der Granuloblastenmitosen,
Versuch I - V: n=5

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	44	3270	2,202	0,14	n. s.
	100% ES	57	3139			
72 h	40% ES	74	4258	0,453	0,49	n. s.
	100% ES	45	4116			

Tabelle 6: Signifikanzberechnung der Granuloblastenmitosen,
Versuch I, II, III: n=3

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	23	1993	2,539	0,11	n. s.
	100% ES	31	1734			
	40% ES	23	1993	0,02	0,89	n. s.
	40% CML	43	2860			
	40% CML	43	2860	0,941	0,33	n. s.
	100% CML	33	2756			
	100% ES	31	1734	2,566	0,11	n. s.
	100% CML	33	2756			
72 h	40% ES	28	2673	0,247	0,59	n. s.
	100% ES	31	2594			
	40% ES	28	2673	11,245	0,001	s.
	40% CML	54	2387			
	40% CML	54	2387	5,398	0,02	z. s.
	100% CML	34	2497			
	100% ES	31	2594	0,275	0,59	n. s.
	100% CML	34	2497			

Erklärung der Abkürzungen s. S. 27.

Tabelle 7: Signifikanzberechnung der Granuloblastenmitosen,
Versuch IV, V: n=2

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	21	1277	0,168	0,66	n. s.
	100% ES	26	1405			
72 h	40% ES	46	1585	15,507	0,0001	s.
	100% ES	14	1522			

Tabelle 8: Signifikanzberechnung der Erythroblastenmitosen,
Versuch I, II, III: n=3

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	21	1357	9,22	0,003	s.
	100% ES	55	1649			
	40% ES	21	1357	0,468	0,48	n. s.
	40% CML	16	821			
	40% CML	16	821	0,237	0,66	n. s.
	100% CML	13	804			
	100% ES	55	1649	5,594	0,015	z. s.
	100% CML	13	804			
72 h	40% ES	7	419	2,46	0,12	n. s.
	100% ES	9	244			
	40% ES	7	419	0,464	0,48	n. s.
	40% CML	1	122			
	40% CML	1	122	2,0	0,16	n. s.
	100% CML	1	122			
	100% ES	9	244	2,457	0,12	n. s.
	100% CML	1	122			

Erklärung der Abkürzungen:

n. s.: nicht signifikant

z. s.: zweifelhaft signifikant

s.: signifikant

Tabelle 9: Signifikanzberechnung der Erythroblastenmitosen,
Versuch I - V: n=5

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	50	2585	4,683	0,03	z. s.
	100% ES	76	2646			
72 h	40% ES	17	789	0,012	0,92	n. s.
	100% ES	13	577			

Tabelle 10: Signifikanzberechnung der Erythroblastenmitosen,
Versuch IV und V: n=2

h		B _M	B _N	χ^2	p	
24 h	40% ES	29	1228	0,162	0,66	n. s.
	100% ES	21	997			
72 h	40% ES	10	370	1,977	0,16	n. s.
	100% ES	4	333			

Erklärung der Abkürzungen s. S. 22 und 27.

Tabelle 11: G/E - Indices

Versuch	O	h	24 h					72 h				
			40 ES	100 ES	40 CML	100 CML	40 ES	100 ES	40 CML	100 CML	40 CML	100 CML
I	$\frac{1082}{652}$	1,7	$\frac{1094}{522}$	$\frac{1101}{566}$	$\frac{1103}{548}$	$\frac{1147}{535}$	$\frac{1377}{222}$	$\frac{1519}{95}$	$\frac{1414}{251}$	$\frac{1591}{117}$	$\frac{1414}{251}$	$\frac{1591}{117}$
II	$\frac{1474}{304}$	4,8	$\frac{1313}{487}$	$\frac{855}{888}$	$\frac{1402}{390}$	$\frac{1332}{506}$	$\frac{1586}{84}$	$\frac{1517}{100}$	$\frac{1398}{99}$	$\frac{1423}{31}$	$\frac{1398}{99}$	$\frac{1423}{31}$
III	$\frac{832}{878}$	0,9	$\frac{552}{565}$	$\frac{894}{880}$	$\frac{1433}{218}$	$\frac{1469}{88}$	$\frac{1374}{355}$	$\frac{1506}{247}$	$\frac{1690}{26}$	$\frac{1651}{49}$	$\frac{1690}{26}$	$\frac{1651}{49}$
IV	$\frac{1298}{559}$	2,4	$\frac{1056}{782}$	$\frac{1076}{616}$			$\frac{1467}{266}$	$\frac{1426}{125}$				
V	$\frac{1015}{662}$	1,5	$\frac{862}{605}$	$\frac{728}{619}$			$\frac{1457}{170}$	$\frac{1488}{316}$				

Mittelwerte der G/E - Indices

n=5	$\frac{5701}{3055}$	1,9	$\frac{4877}{2961}$	$\frac{1,7}{3369}$	$\frac{4654}{3369}$	1,4	$\frac{7261}{1057}$	6,6	$\frac{7456}{883}$	8,4		
n=3	$\frac{3388}{1834}$	1,9	$\frac{2959}{1574}$	$\frac{1,9}{2134}$	$\frac{2850}{2134}$	1,3	$\frac{3938}{1156}$	3,4	$\frac{3948}{1129}$	3,5	$\frac{4337}{661}$	6,6
n=2	$\frac{2313}{1221}$	1,9	$\frac{1918}{1387}$	$\frac{1,4}{1235}$	$\frac{1804}{1235}$	1,5	$\frac{2924}{436}$	6,7	$\frac{2914}{441}$	6,6	$\frac{4502}{376}$	12,0

Tabelle 12: Zeichenklärung: n=5: Versuch I - V

n=3: Versuch I, II, III

n=2: Versuch IV, V

$\frac{4665}{197}$

Tabelle 13: Signifikanzberechnung der G/E - Indices,
Versuch I - V: n=5

h		B _G	B _E	χ^2	p	
24 h	40% ES	4877	2961	29,36	$p < 10^{-7}$	s.
	100% ES	4654	3369			
72 h	40% ES	7261	1097	25,70	$p < 10^{-6}$	s.
	100% ES	7456	883			

Tabelle 14: Signifikanzberechnung der G/E - Indices,
Versuch I, II, III: n=3

h		B _G	B _E	χ^2	p	
24 h	40% ES	2959	1574	65,38	$p < 10^{-10}$	s.
	100% ES	2850	2134			
	40% ES	2959	1574	170,86	$p < 10^{-10}$	s.
	40% CML	3938	1156			
	40% CML	3938	1156	0,308	$p = 0,56$	n. s.
	100% CML	3948	1129			
	100% ES	2850	2134	486,06	$p < 10^{-10}$	s.
	100% CML	3948	1129			
72 h	40% ES	4337	661	48,21	$p < 10^{-10}$	s.
	100% ES	4542	442			
	40% ES	4337	661	79,97	$p < 10^{-10}$	s.
	40% CML	4502	376			
	40% CML	4502	376	58,70	$p < 10^{-10}$	s.
	100% CML	4665	197			
	100% ES	4542	442	94,08	$p < 10^{-10}$	s.
	100% CML	4665	197			

Erklärung der Abkürzungen s. S. 31.

Tabelle 15: Signifikanzberechnung der G/E - Indices,
Versuch IV, V: n=2

h		B _G	B _E	χ^2	p	
24 h	40% ES	1918	1387	1,15	0,31	n. s.
	100% ES	1804	1235			
72 h	40% ES	2924	436	0,41	0,54	n. s.
	100% ES	2914	441			

Erklärung der Abkürzungen:

n. s.: nicht signifikant

z. s.: zweifelhaft signifikant

s.: signifikant

B_G: Beobachtungswert der Granuloblasten

B_E: Beobachtungswert der Erythroblasten

h: Kulturdauer in Stunden

χ^2 : Ergebnis der Signifikanzberechnung

p: Wahrscheinlichkeitswert

Versuch I:

Mitoseindices

In der Granulopoese (Tab. 1) ist der Ausgangsmitoseindex sehr niedrig, steigt bei Zusatz von 40% Eigenserum bis 24 Stunden an und ist bis 72 Stunden wieder rückläufig. Bei Zusatz von 100% Eigenserum kommt es bis 24 Std. zu einem fast gleich hohen Anstieg, der sich bis 72 Std. noch fortsetzt.

Die Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum A erreicht bis 24 Std. einen im Vergleich zur Kultur mit 40% ES-Zusatz doppelt so hohen Mitoseindex, der bis 72 Std. nur leicht abgesunken ist.

Dagegen bewirkt der Zusatz von 100% CML-Serum A nur einen mittleren Anstieg, der sich aber fortsetzt und bis 72 Std. den Wert des 40% CML-Serumzusatz erreicht.

Der Ausgangsmitoseindex in der Erythropoese (Tab. 3) ist auch erniedrigt, steigt innerhalb der ersten 24 Stunden bei Zusatz von 40% Eigenserum an und bleibt bis 72 Std. gleich hoch. Der Zusatz von 100% ES bewirkt innerhalb der ersten 24 Stunden fast eine Verzehnfachung des Ausgangswertes. Bis 72 Std. ist der Mitoseindex sogar noch weiter angestiegen, doch muß man hier berücksichtigen, daß die Anzahl der teilungsfähigen Erythroblasten nur noch 70 beträgt.

Die Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum A zeigt bis 24 Std. im Vergleich zur Kultur mit 40 % ES-Zusatz einen deutlichen Anstieg des rMI, der bei Zusatz von 100% CML-Serum A noch etwas höher ausfällt. Bis 72 Std. haben beide Mitoseindices wieder abgenommen und liegen nahe beieinander.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1 u. 2)

Im Originalpräparat ist der Anteil der teilungsfähigen Granuloblasten vermindert. Dies stimmt mit dem erniedrigten Ausgangsmitoseindex überein. Im Verlauf der Ausreifung der Kultur mit 40% ES-Zusatz erhöht sich der Anteil der Promyelozyten, während gleichzeitig der Anteil der segmentkernigen

Granulozyten langsam ansteigt. Dies ist als Kompensation der anfangs gehemmten Ausreifung zu erklären und setzt sich bis 72 Stunden fort.

Bei Zusatz von 100% ES vermehren sich die Promyelozyten weniger stark. Die Ausreifung ist mehr beschleunigt als bei Zusatz von 40% ES.

Die CML-Serumzusätze beeinflussen die Ausreifung gleichsinnig und stärker als die Eigenserumzusätze. Auch hier bewirkt der Zusatz von 100% CML-Serum A im Vergleich zum 40% CML-Serumzusatz eine starke Beschleunigung der Ausreifung, die sich schon in den ersten 24 Stunden zeigt.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 3 u. 4)

Das Originalpräparat zeigt eine normale Verteilung der erythropoetischen Vorstufen. Die Kultur mit 40% ES-Zusatz zeigt einen normalen Verlauf der Ausreifung. Bis 72 Std. haben die Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten wieder zugenommen, jedoch hat sich gleichzeitig der Anteil der reifen Erythroblasten erhöht.

Im Gegensatz dazu wird in der Kultur mit Zusatz von 100% ES bereits bis 24 Std. eine relative Zunahme der unreifen Vorstufen beobachtet, die sich bis 72 Std. entsprechend dem sehr hohen Mitoseindex weiter stark vermehren.

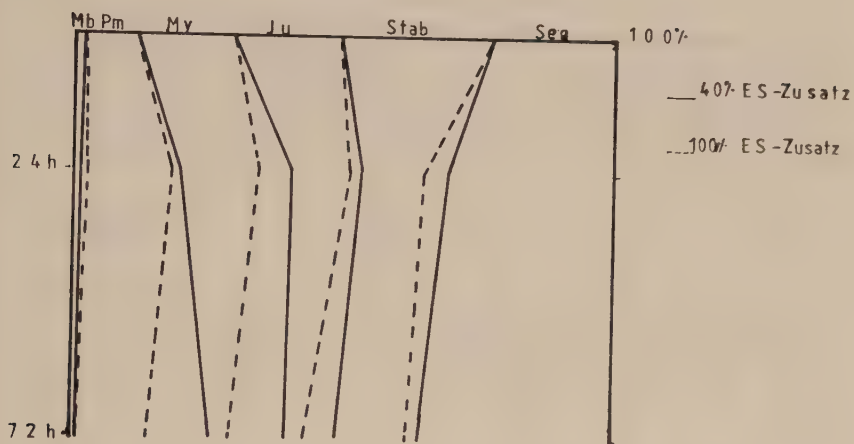
Die Kulturen mit CML-Serum A-Zusätzen zeigen beide im Vergleich zur Kultur mit 40% ES-Zusatz eine beschleunigte Ausreifung, wobei der Zusatz von 100% CML-Serum A im Vergleich zum 40% CML-Serumzusatz die Ausreifung etwas weniger beschleunigt. Bei beiden CML-Serumzusätzen nimmt der Anteil der unreifen Vorstufen bis 72 Std. kontinuierlich ab.

G/E - Index (Tab. 11)

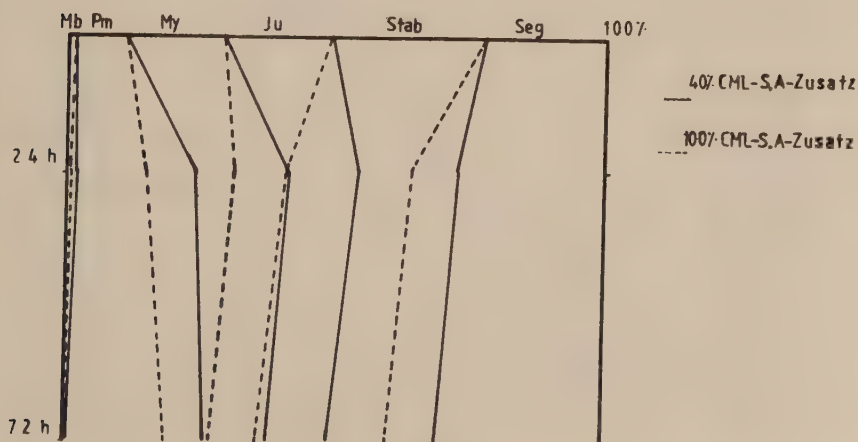
Der G/E - Index des Originalpräparates ist stark erniedrigt, übersteigt aber in der Kultur mit 40% Eigenserumzusatz unter kontinuierlicher Zunahme bis 72 Stunden den Normalwert.

Bei Zusatz von 100% ES steigt der G/E - Index innerhalb der ersten 24 Stunden langsamer an, übertrifft aber bis 72 Std.

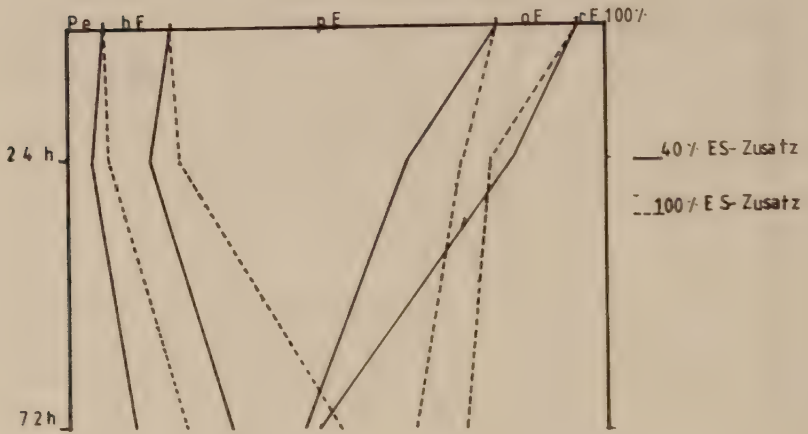
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch I, Abb. 1



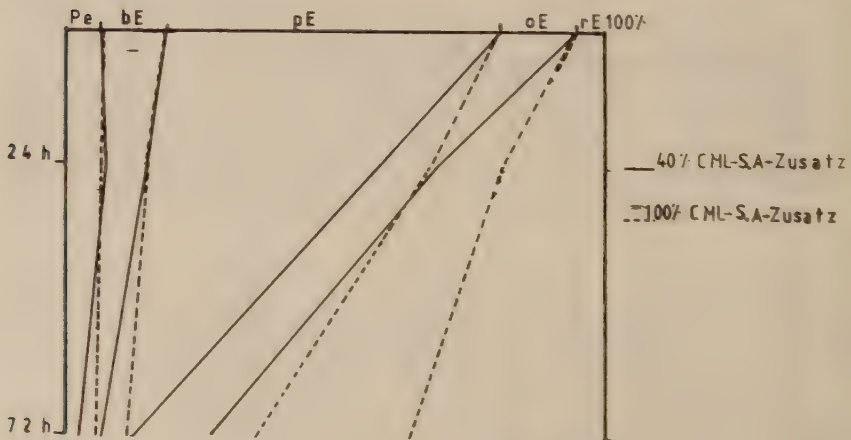
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch I, Abb. 2



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch I, Abb. 3



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch I, Abb. 4



den Normalwert um ein Vielfaches, entsprechend der massiven Abnahme der Erythroblasten.

Beide Kulturen mit CML-Serumzusätzen zeigen bis 24 Stunden eine ebensolche Zunahme des G/E - Index wie die Kultur mit 40% ES-Zusatz. Dem Verhältnis der Eigenserumzusätze entsprechend steigt der G/E - Index bis 72 Stunden bei 100 prozentigem CML-Serumzusatz stärker an als bei 40% CML-Serumzusatz.

Versuch II:

Mitoseindices

Der im Originalpräparat kaum erhöhte Ausgangsmitoseindex der Granulopoese (Tab. 1) steigt bei Zusatz von 40% Eigenserum bis 24 Std. nicht weiter an, sinkt dann aber wie üblich bis 72 Stunden ab.

Dagegen bewirkt der Zusatz von 100% Eigenserum einen verstärkten Anstieg bis 24 Std., dem auch eine Abnahme der Mitoseaktivität bis 72 Std. folgt.

Die Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum A zeigt bis 24 Std. einen Abfall des Mitoseindex, dem bis 72 Std. ein Anstieg folgt.

In der Kultur mit Zusatz von 100% CML-Serum A ändert sich der Mitoseindex innerhalb der ersten 24 Stunden nicht, bis 72 Stunden ist er nur geringfügig abgesunken.

Der Mitoseindex in der Erythropoese (Tab. 3) zeigt einen erhöhten Ausgangswert, der in der Kultur mit 40% Eigenserumzusatz bis 24 Std. rückläufig ist. Der Zusatz von 100% Eigenserum bewirkt dagegen einen weiteren Anstieg der Mitoserate. Die Indices bis 72 Std. müssen unter Vorbehalt betrachtet werden, da hier die Zahl der teilungsfähigen Erythroblasten auf 57/ 2000 differenzierte Zellen (40% ES-Zusatz), bzw. 32/ 2000 Zellen (100% ES-Zusatz) zurückgegangen ist.

Der Zusatz von 40% CML-Serum A bewirkt eine geringe Abnahme der Mitosehäufigkeit innerhalb der ersten 24 Stunden. Bei Zusatz von 100% CML-Serum A reduziert sich der rote Mitose-

index auf die Hälfte des Wertes bei 40% CML-Serumzusatz. Bis 72 Stunden werden in beiden Kulturen mit CML-Serumzusätzen nur noch wenige Zellen und keine Mitosen mehr beobachtet.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 5 u. 6)

Das Originalpräparat zeigt eine normale Verteilung der Granulopoese. Die Kultur mit 40% Eigenserumzusatz zeigt eine starke Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten innerhalb der ersten 24 Stunden. Bis 72 Std. zeigt sich keine Zunahme der reifen Zellen.

Bei Zusatz von 100% ES nehmen die teilungsfähigen Granuloblasten bis 24 Std. weniger zu. Dafür steigt der Anteil der stabkernigen Granulozyten, während sich der Anteil der Segmentkernigen verringert. Auch hier zeigt sich als Ausdruck der gehemmten Ausreifung keine Zunahme der reifen Zellen bis 72 Std..

Der Zusatz von 40% CML-Serum A bewirkt bis 24 Std. eine deutliche Zunahme der teilungsfähigen Granuloblasten, vor allem der Promyelozyten.

Bei Zusatz von 100% CML-Serum A steigt der Anteil der Granuloblasten sogar noch stärker an. Bis 72 Std. tritt jedoch dann bei beiden Kulturen mit CML-Serumzusätzen eine beschleunigte Ausreifung ein.

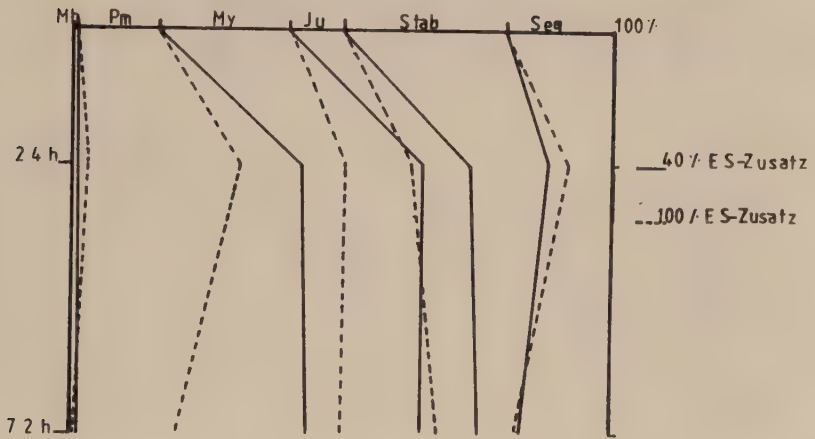
Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 7 u. 8)

Im Originalpräparat besteht eine Verschiebung zugunsten der unreifen Vorstufen. In der Kultur mit 40% Eigenserumzusatz nimmt der Anteil der Proerythroblasten bis 72 Std. nur geringfügig ab, die reifen Erythroblasten vermehren sich nur langsam. Die Ausreifung ist verzögert.

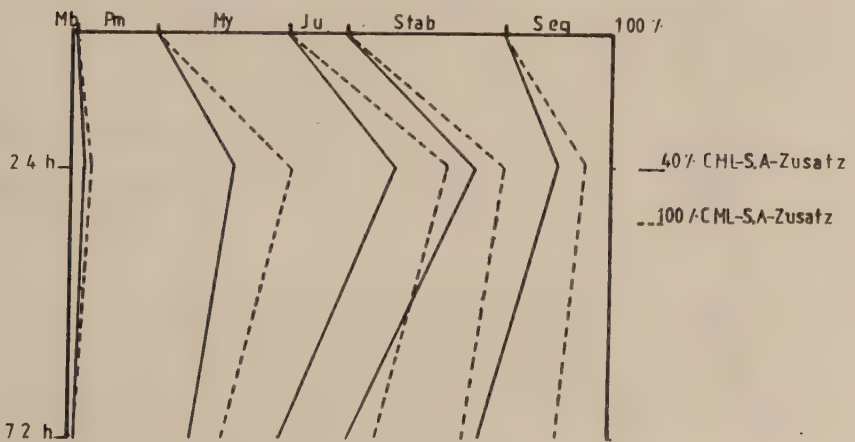
Im Gegensatz dazu vermehren sich unter Zusatz von 100% ES schon bis 24 Std. die reifen und auch die oxyphilen Erythroblasten sehr stark. Ihr Anteil steigt weiter bis 72 Std.. Die Ausreifung ist beschleunigt.

Auch die beiden Kulturen mit CML-Serum A-Zusätzen zeigen eine im Vergleich zur Kultur mit 40% ES-Zusatz beschleunigte

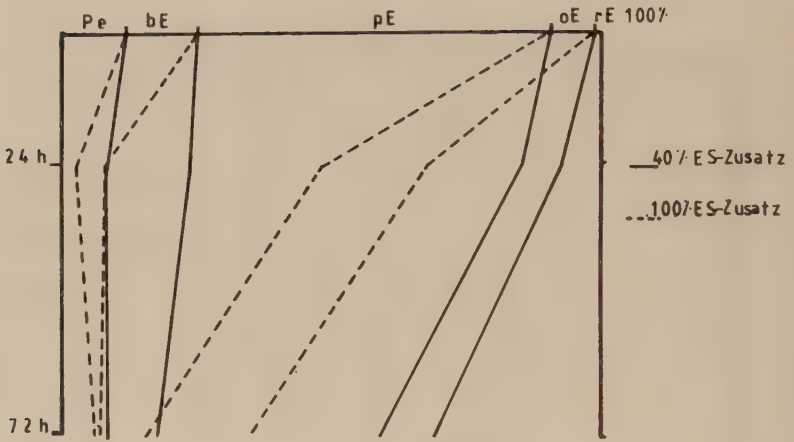
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch II, Abb. 5



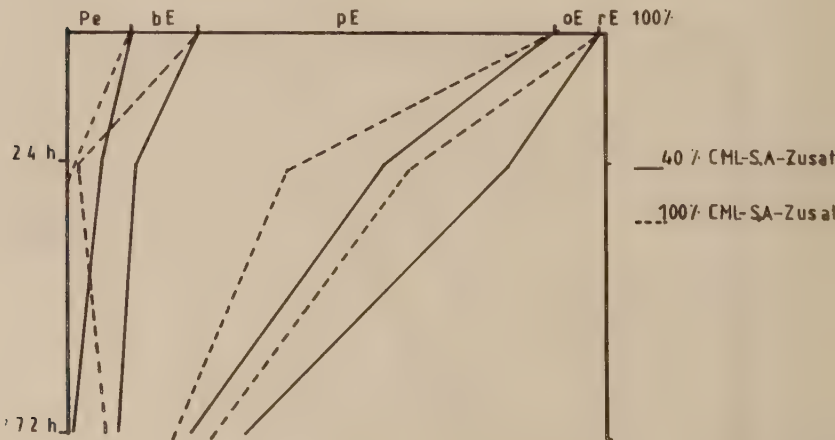
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch II, Abb. 6



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch II, Abb. 7



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch II, Abb. 8



nigte Ausreifung. Der Zusatz von 100% CML-Serum A bewirkt sogar noch eine schnellere Ausreifung als der Zusatz von 100% ES, sodaß bis 72 Std. keine Proerythroblasten mehr nachweisbar sind.

Durch Zusatz von 40% CML-Serum A wird erst bis 72 Std. eine dem höherkonzentriertem CML-Serum vergleichbare Ausreifungsbeschleunigung erreicht.

G/E - Indices (Tab.11)

Der Ausgangswert ist leicht erhöht. Der G/E - Index sinkt in der Kultur mit Zusatz von 40% ES bis 24 Stunden ab, ist aber bis 72 Std. wieder um ein Vielfaches gestiegen. Sowohl der Zusatz von 100% Eigenserum als auch die beiden CML-Serum A-Zusätze bewirken dem entsprechende, gleichsinnige Veränderungen des G/E - Index. Allein der Zusatz von 100% CML-Serum verringert die Anzahl der Erythroblasten bis 72 Std. so sehr, daß der G/E - Index ungewöhnlich hoch ausfällt.

Versuch III:

Mitoseindices

Der Mitoseindex der Granulopoese (Tab. 1) ist im Originalpräparat sehr niedrig. Die Kultur mit 40% ES-Zusatz zeigt bis 24 Std. eine Zunahme der Mitosehäufigkeit, die sich bis 72 Std. nochmal verdoppelt.

Der Zusatz von 100% Eigenserum bewirkt im Vergleich dazu innerhalb der ersten 24 Stunden einen höheren Anstieg des Mitoseindex, bis 72 Std. jedoch eine Abnahme der Mitosehäufigkeit.

Beide CML-Serum B-Zusätze erhöhen ebenfalls bis 24 Std. den Mitoseindex. Die Kultur mit 40% CML-Serumzusatz zeigt dann bis 72 Std. eine weitere Erhöhung des Mitoseindex, entsprechend der Wirkung des 40% ES-Zusatz. Dagegen zeigt sich bei Zusatz von 100% CML-Serum bis 72 Std. keine weitere Änderung des Mitoseindex.

Der Ausgangswert des Mitoseindex in der Erythropoese (Tab.3) ist leicht erniedrigt. Bei Zusatz von 40% ES steigt er bis 24 Std. an, fällt dann aber bis 72 Std. wieder unter den Ausgangswert.

Auch der Zusatz von 100% ES bewirkt bis 24 Std. eine Zunahme der Mitosehäufigkeit, die sich bis 72 Std. nur wenig verringert hat.

Im Gegensatz dazu zeigt die Kultur mit Zusatz von 40% CML-Serum B bis 24 Std. einen sehr niedrigen Mitoseindex. Bis 72 Std. werden nur noch wenige Zellen und keine Mitosen mehr beobachtet.

Bei Zusatz von 100% CML-Serum B zeigt sich schon innerhalb der ersten 24 Stunden eine massive Abnahme der teilungsfähigen Erythroblasten. Es werden überhaupt keine Mitosen beobachtet.

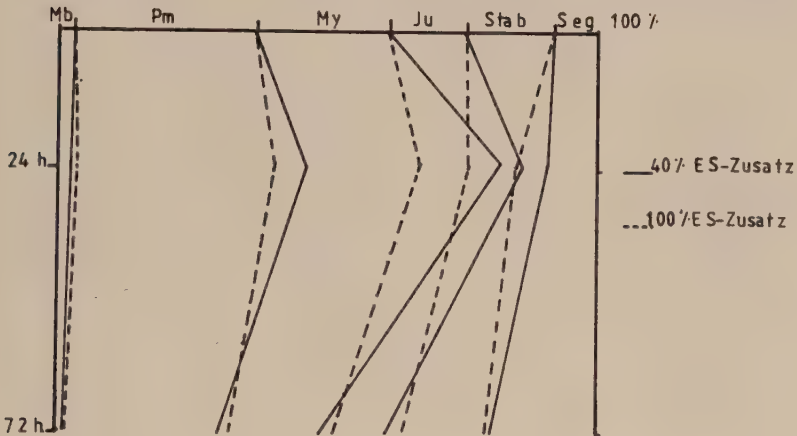
Reifungskurve der Granulopoese (Abb.9 u.10)

Im Originalpräparat besteht eine Verschiebung zugunsten der unreifen Vorstufen, vor allem der Promyelozyten. In der Kultur mit 40% ES-Zusatz steigt der Anteil der teilungsfähigen Granuloblasten noch bis 24 Std., um dann bis 72 Std. langsam zurückzugehen. Die stab- und segmentkernigen Granulozyten haben sich jetzt vermehrt. Unter Berücksichtigung des stark erhöhten Mitoseindex bis 72 Std. kann man vermuten, daß die anfangs beobachtete Vermehrung der unreifen Granuloblasten durch eine beschleunigte Ausreifung im Kulturverlauf kompensiert wird.

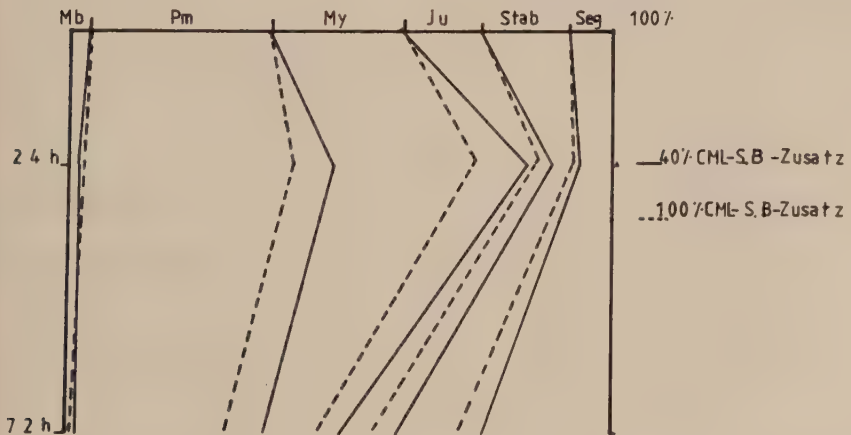
In der Kultur mit 100% ES-Zusatz vermehren sich die teilungsfähigen Granuloblasten bis 24 Std. nicht so stark. Bis 72 Std. zeigt sich dann ebenfalls eine Zunahme des Anteil der stab- und segmentkernigen Granulozyten.

Auch in diesem Versuch zeigt sich, daß beide CML-Serum-Zusätze eine zu den Eigenserumzusätzen gleichsinnige Wirkung haben. Bei Zusatz von 40% CML-Serum B vermehren sich innerhalb der ersten 24 Stunden die unreifen Vorstufen sogar noch stärker als bei Zusatz von 40% ES. Bis 72

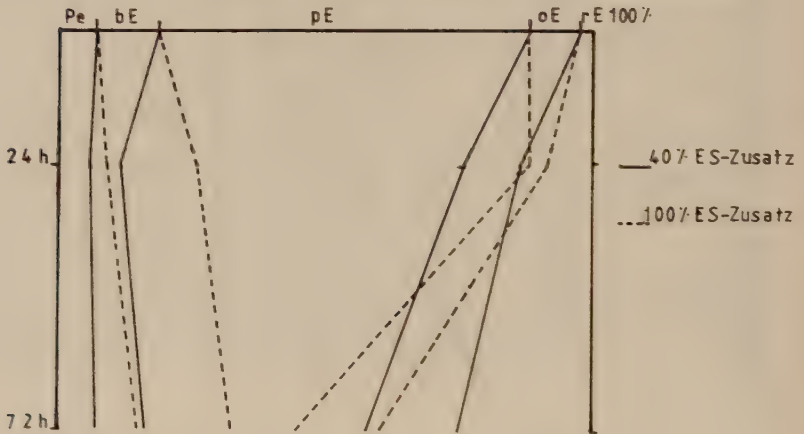
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch III, Abb. 9



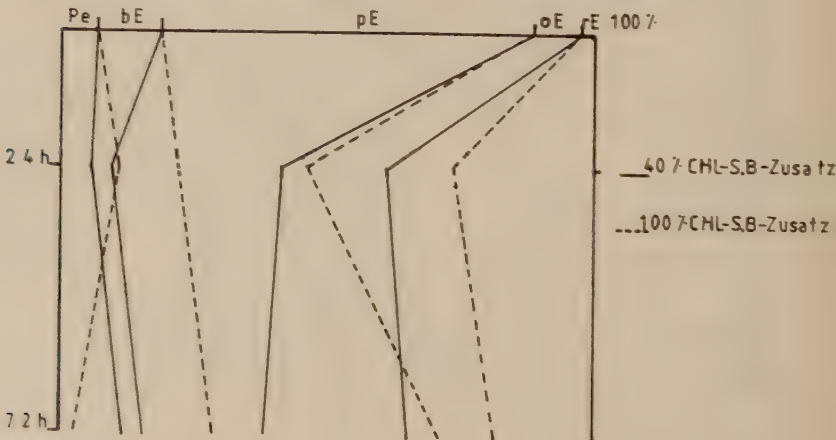
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch III, Abb. 10



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch III, Abb. 11



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch III, Abb. 12



Stunden wird dann ein der Kultur mit 40% ES-Zusatz entsprechender Ausreifungsgrad erreicht.

Der 100% CML-Serumzusatz B bewirkt, entsprechend dem 100% ES-Zusatz, eine nicht so große Zunahme der teilungsfähigen Granuloblasten.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 11 u. 12)

Das Originalpräparat zeigt, abgesehen von einer leichten Verminderung der oxyphilen und reifen Erythroblasten, eine normale Verteilung. In der Kultur mit Zusatz von 40% vermehren sich die reifen Erythroblasten nur langsam. Die basophilen Erythroblasten verringern sich bis 24 Std., doch steigt ihr Anteil bis 72 Std. wieder an. Dies erklärt auch den gesteigerten roten Mitoseindex. Auffällig ist die deutliche Zunahme der oxyphilen Erythroblasten bis 72 Std.. Die Ausreifung ist insgesamt verzögert.

Wie im Versuch I bewirkt auch hier der Zusatz von 100% ES eine kontinuierliche Vermehrung der unreifen Vorstufen. Die reifen Erythroblasten zeigen bis 24 Std. eine langsame Zunahme ihres Anteils, haben sich dann aber bis 72 Std. stark vermehrt.

Dagegen vermehren sich in der Kultur mit 40% CML-Serum B-Zusatz sowohl die oxyphilen als auch die reifen Erythroblasten schon innerhalb der ersten 24 Stunden sehr stark. Der Anteil der oxyphilen Erythroblasten steigt sogar bis 72 Std. weiter an, während sich die reifen Erythroblasten nicht mehr vermehren. Insgesamt erreicht diese Kultur einen höheren Grad der Ausreifung als die Kultur mit Zusatz von 40% ES.

Der Zusatz von 100% CML-Serum B führt bis 72 Std. zu einer Vermehrung der basophilen Erythroblasten unter Verringerung der Proerythroblasten. Die oxyphilen und reifen Erythroblasten vermehren sich ebenfalls in den ersten 24 Stunden. Dann nimmt aber ihr Anteil bis 72 Std. so stark ab, daß man von einer massiven Ausreifungshemmung ausgehen muß.

G/E - Indices (Tab. 11)

Der Ausgangswert ist stark erniedrigt. Bei beiden Eigensernumzusätzen verändert er sich nicht innerhalb der ersten 24 Stunden. Bis 72 Std. zeigt sich bei beiden eine Zunahme des G/E - Index, die bei dem 100% ES-Zusatz höher ausfällt.

Dagegen steigt der Index bei den CML-Serumzusätzen schon bis 24 Std. an, beim 100% CML-Serumzusatz stärker als beim Zusatz von 40% CML-Serum B. Bis 72 Std. hat er sich in der Kultur mit 40% CML-Serumzusatz auf das Zehnfache des 24-Stundenwertes erhöht, während der weitere Anstieg in der Kultur mit höher konzentriertem CML-Serumzusatz nicht so stark ist. Gleichzeitig hat sich bei beiden die Anzahl der teilungsfähigen Erythroblasten sehr verringert. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Versuch II überein.

Versuch IV:

Mitoseindices

Der Mitoseindex der Granulopoese (Tab. 1) ist im Originalpräparat erhöht und steigt in der Kultur mit 40% ES-Zusatz bis 72 Std. kontinuierlich an.

Dagegen bewirkt der Zusatz von 100% Eigensernum eine stetige Abnahme der Mitosehäufigkeit bis 72 Std.

Der Ausgangsmitoseindex in der Erythropoese (Tab. 3) ist normal. Der Zusatz von 40% Eigensernum führt auch hier zu einer Zunahme der Mitosehäufigkeit bis 72 Std.

Bei Zusatz von 100% ES steigt der rote Mitoseindex bis 24 Std. leicht an. Bis 72 Std. zeigt er dann eine rückläufige Tendenz und liegt unter dem Ausgangswert. Dabei wird nur eine Mitose auf 65 Erythroblasten beobachtet.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 13)

Im Originalpräparat zeigt sich eine Vermehrung der unreifen Vorstufen. Ihr Anteil nimmt bei Zusatz von 40% ES bis 24 Std. noch zu. Bis 72 Std. kommt es jedoch dann unter schnell-

ler Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten zur Ausreifung.

Bei Zusatz von 100% Eigenserum vermehren sich die unreifen Vorstufen weniger bis 24 Std.. Andererseits erreicht diese Kultur bis 72 Std. nicht den Grad der Ausreifung der Kultur mit Zusatz von 40% ES.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 14)

Im Originalpräparat liegt eine normale Verteilung der erythropoetischen Vorstufen vor. In der Kultur mit Zusatz von 40% Eigenserum verringert sich der Anteil der reifen Erythroblasten bis 24 Std.. Erst bis 72 Std. zeigt sich eine leichte Vermehrung. Die Ausreifung ist verzögert.

Bei Zusatz von 100% ES zeigt sich dagegen eine normale Ausreifung unter kontinuierlicher Zunahme der reifen Erythroblasten bis 72 Std.

G/E - Indices (Tab. 11)

Der Ausgangswert ist erniedrigt. Er sinkt in der Kultur mit Zusatz von 40% ES bis 24 Std. ab, steigt dann aber bis 72 Std. wieder an.

Der Zusatz von 100% ES bewirkt eine gleichsinnige Veränderung des G/E - Index. Der Anstieg bis 72 Std. ist aber höher.

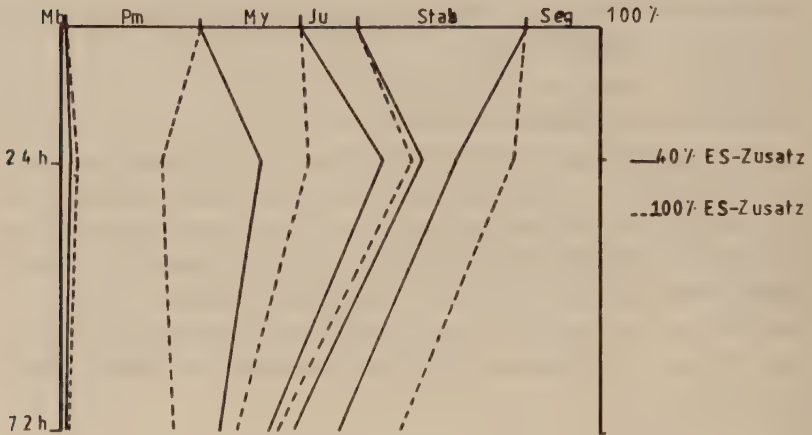
Versuch V:

Mitoseindices

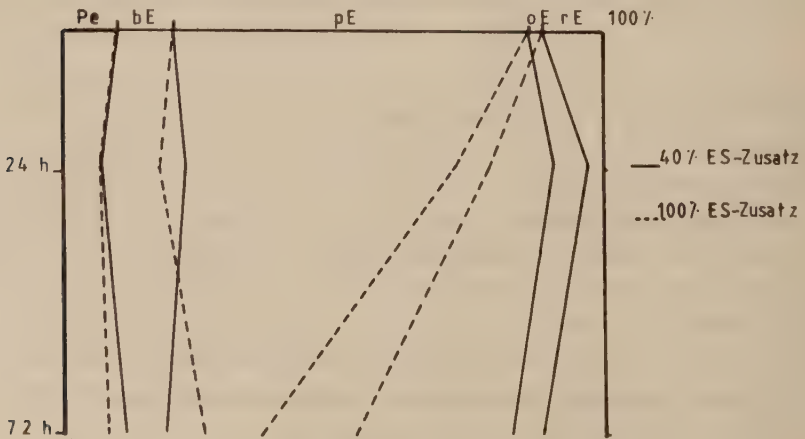
Der weiße Mitoseindex (Tab. 1) ist im Originalpräparat stark erniedrigt. Er steigt in der Kultur mit 40% ES-Zusatz bis 24 Std. an. Nach 72 Std. zeigt sich eine weitere massive Zunahme der Mitosehäufigkeit.

Bei Zusatz von 100% ES steigt der Mitoseindex bis 24 Std. ebenfalls an, wenn auch weniger als bei Zusatz des niedriger konzentrierten Eigenserums. Dann zeigt sich aber bis 72 Std. eine Abnahme der Mitosehäufigkeit.

Reifungskurve der Granulopoese, Versuch IV, Abb. 13



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch IV, Abb. 14



In der Erythropoese (Tab.3) ist der Mitoseindex des Originalpräparates erniedrigt. Bei Zusatz von 40% Eigenserum steigt er bis 72 Std. kontinuierlich an.

Der Zusatz von 100% ES bewirkt bis 24 Std. einen etwas höheren Anstieg des Mitoseindex als der 40% ES-Zusatz. Dagegen zeigt sich bis 72 Std. eine Abnahme des Mitoseindex, der unter den Ausgangswert fällt.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 15)

Das Originalpräparat zeigt eine Vermehrung der nicht mehr teilungsfähigen Granulozyten. Innerhalb der ersten 24 Stunden nimmt deren Anteil in der Kultur mit 40% ES-Zusatz ab. Die Promyelozyten und Myelozyten vermehren sich sehr stark. Bis 72 Std. ist der Anteil der reifen Granulozyten wieder angestiegen.

Der Zusatz von 100% ES bewirkt eine gleichsinnige Änderung der Anteile der granulozytären Vorstufen, doch ist die Verringerung der reifen Granulozyten bis 24 Std. nicht so stark ausgeprägt.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 16)

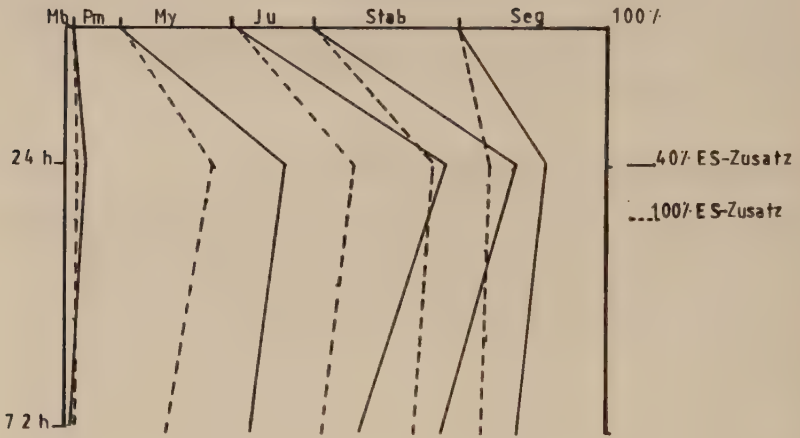
Das Originalpräparat zeigt eine Erhöhung des Anteils der basophilen und oxyphilen Erythroblasten. Der Zusatz von 40% ES bewirkt eine kontinuierliche Zunahme des Anteils der oxyphilen Erythroblasten bis 72 Std.. Dagegen vermehren sich die reifen Erythroblasten nicht so stark.

Auch in der Kultur mit 100% ES-Zusatz ist der Anteil der oxyphilen Erythroblasten erhöht. Außerdem findet sich hier eine Verringerung der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten bis 72 Std.

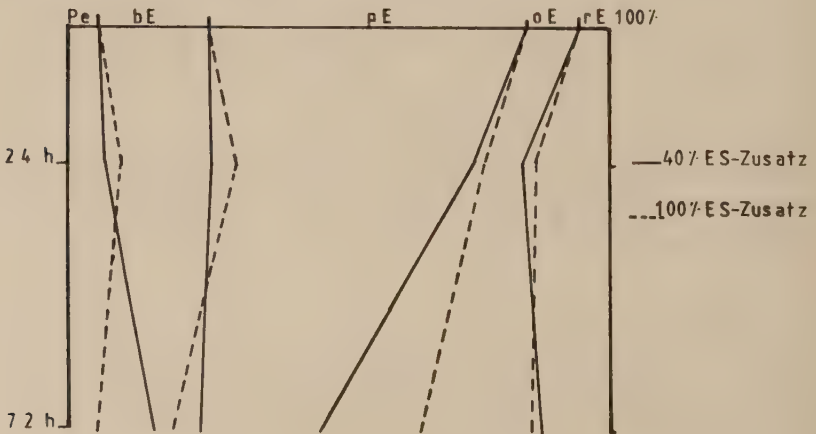
G/E - Indices (Tab. 11)

Der G/E - Index des Originalpräparates ist erniedrigt. Beide Eigenserumzusätze bewirken einen weiteren Abfall bis 24 Std. und einen Anstieg bis 72 Std., der beim 40% ES-Zusatz höher ausfällt.

Reifungskurve der Granulopoese, Versuch V, Abb. 15



Reifungskurve der Erythropoese, Versuch V, Abb. 16



IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittlere Mitoseindices

In der Granulopoese entspricht der mittlere Ausgangswert des Mitoseindex aller fünf Versuche (Tab. 2, S. 23; Abb. 17, S. 51) dem von Boll (14) an Suspensionskulturen ermittelten Wert. Bei Zusatz von 40% Eigenserum zeigt sich eine stetige Zunahme der Mitosehäufigkeit bis 72 Std..

Der Zusatz von 100% Eigenserum bewirkt bis 24 Std. eine höhere Steigerung des weißen Mitoseindex als der Zusatz von 40% ES. Nach 72 Std. ist der Mitoseindex jedoch wieder stark abgefallen.

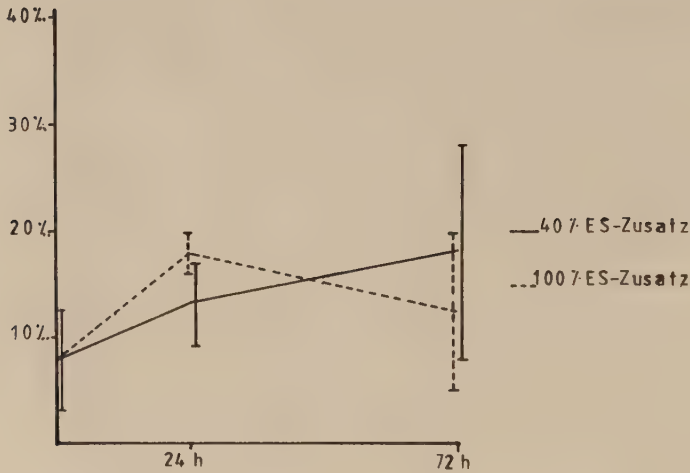
Bei Betrachtung der mittleren Mitoseindices der Versuche I, II, III (Abb. 18) und der Versuche IV und V (Abb. 19) bestätigt sich trotz geringfügiger Abweichungen das oben beschriebene Verhalten des mittleren weißen Mitoseindex unter Eigenserumzusatz. Bemerkenswert ist, daß der Mittelwert von Versuch IV und V einen signifikanten Abfall des Mitoseindex bis 72 Std. bei Zusatz von 100% ES im Vergleich zu 40% ES zeigt.

Der Zusatz von 40% CML-Serum bewirkt, wie der Zusatz von 40% Eigenserum, eine kontinuierliche Zunahme der Mitosehäufigkeit. Dabei ist die Steigerung des Mitoseindex jedoch wesentlich größer, bis 72 Std. ist die Zunahme des Mitoseindex sogar signifikant höher als bei Zusatz von 40% ES.

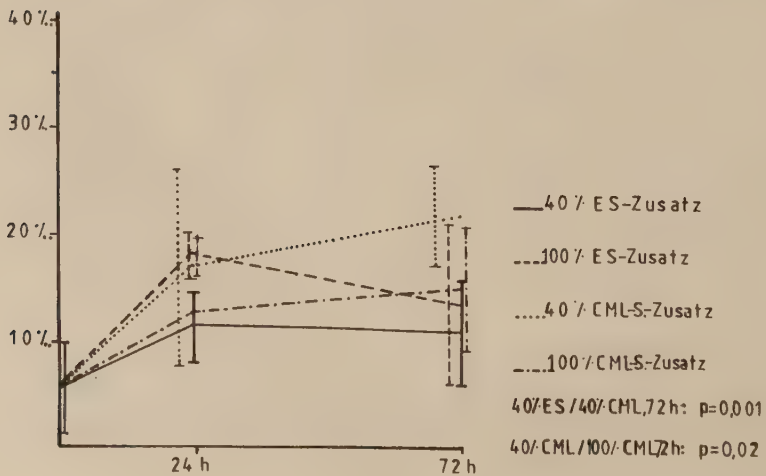
Der Zusatz von 100% CML-Serum bewirkt innerhalb der ersten 24 Stunden eine Steigerung der Mitoserate, die der Wirkung des 40 prozentigen ES-Zusatz entspricht, aber deutlich unter den Mitoseindices der Kulturen mit 40% CML-Serumzusatz, bzw. 100% Eigenserumzusatz liegt. Nach 72 Std. ist der Mitoseindex bei Zusatz von 100% CML-Serum zwar weiter angestiegen, er ist aber immer noch niedriger als in der Kultur mit 40% CML-Serumzusatz.

In der Erythropoese ist der mittlere Ausgangsmitoseindex aller fünf Versuche normal (Tab. 4, S. 24). Obwohl er bei Zusatz von 40% ES bis 72 Stunden kontinuierlich ansteigt (Abb. 20, 21, 22), erreicht er nicht die von Boll (14)

Mittlere Mitoseindices der Granulopoese, Versuch I - V,
n=5, Abb. 17



Mittlere Mitoseindices der Granulopoese, Versuch I, II, III,
n=3, Abb. 18



beobachteten Werte.

Beim Zusatz von 100% ES zeigt sich auch in der Erythropoese, wie beim mittleren weißen Mitoseindex, eine starke Zunahme der Mitosehäufigkeit bis 24 Std., die beim Mittelwert aller fünf Versuche zweifelhaft signifikant ist (Tab. 9, S. 28). Die isolierte Betrachtung der Versuche I, II und III zeigt sogar eine signifikante Zunahme (Tab. 8, S. 27). Bis 72 Std. fällt der Mittelwert aller fünf Versuche mässig ab.

Betrachtet man den mittleren roten Mitoseindex der Versuche IV und V (Abb. 20) vom Knochenmark der Patienten mit Anämie, so fällt auf, daß der Ausgangswert nur wenig über dem oben beschriebenen Wert liegt, der Anstieg bei Zusatz von 40% ES aber deutlich höher ausfällt. Davon hebt sich der niedrigere Anstieg der Mitoserate bis 24 Std. bei Zusatz von 100% ES ab, dem ein starker Abfall bis 72 Std. folgt.

Bei Zusatz von CML-Serum (Abb. 22) kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einer geringen Zunahme des mittleren roten Mitoseindex, die bei 40% CML-Serumzusatz stärker ausgeprägt ist und den Wert von 40% ES-Zusatz übertrifft.

Vergleicht man den Wert bei Zusatz von 100% Eigenserum mit dem Wert bei 100% CML-Serumzusatz, so ist die Zunahme des Letzteren signifikant niedriger. Bis 72 Std. fällt der Mitoseindex beider CML-Serumzusätze stark unter den der Eigenserumzusätze.

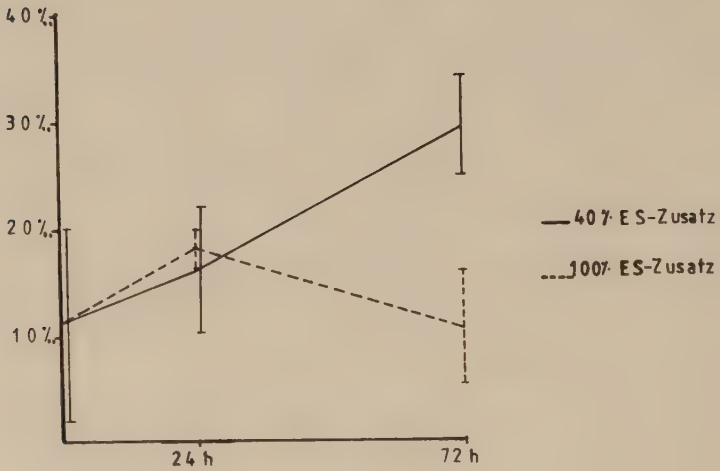
Mittelwertkurve der Reifung in der Granulopoese (Abb. 23-25)

Die Mittelwerte der fünf bzw. drei Originalpräparate zeigen eine normale Verteilung der Granulopoese (Abb. 23, 25).

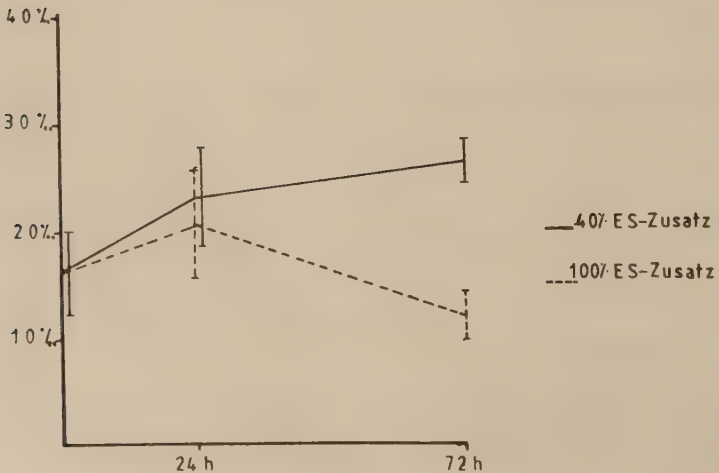
Bei Zusatz von 40% ES nimmt innerhalb der ersten 24 Stunden der Anteil der teilungsfähigen Vorstufen zu. Dies ist, unter Berücksichtigung des steigenden Mitoseindex, als eine erhebliche Regeneration der Knochenmarkszellen aufzufassen. Diese hält, unter mässiger Zunahme des Anteils der stab- und segmentkernigen Granulozyten, bis 72 Std. an. Das entspricht den Beobachtungen von Boll (14).

Im Vergleich dazu nehmen die teilungsfähigen Vorstufen bei

Mittlere Mitoseindices der Granulopoese, Versuch IV, V,
n=2, Abb. 19



Mittlere Mitoseindices der Erythropoese, Versuch IV, V,
n=2, Abb. 20



Zusatz von 100% ES bis 24 Std. weniger zu. Da der Mitoseindex höher als bei 40% ES-Zusatz ist, muß man von einer beschleunigten Regeneration und Ausreifung ausgehen.

Beide CML-Serumzusätze, 40% CML-Serumzusatz noch mehr als 100% CML-Serumzusatz (Abb. 24), bewirken eine verstärkte Zunahme des Anteils der teilungsfähigen Granuloblasten innerhalb der ersten 24 Stunden. Bis 72 Std. folgt unter Erhöhung des mittleren weißen Mitoseindex eine beschleunigte Ausreifung. Sowohl Regeneration als auch Reifung sind im Vergleich zu den Eigenserumzusätzen stärker ausgeprägt.

Mittelwertkurve der Reifung in der Erythropoese (Abb. 26-28)

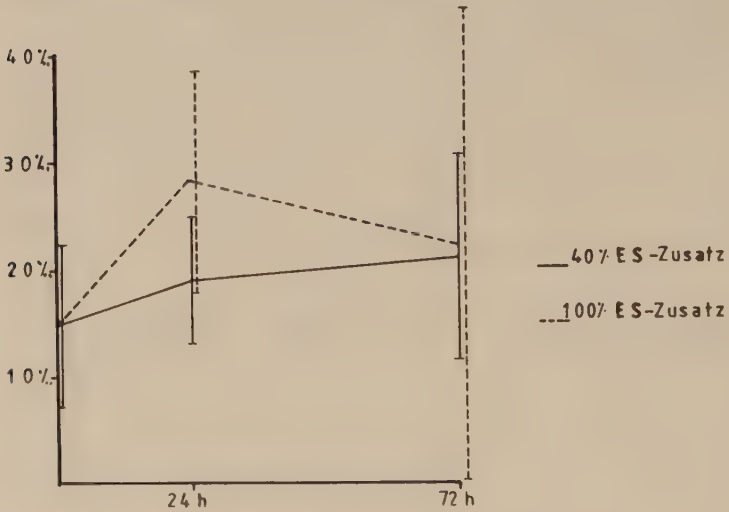
Ausgehend von einer nahezu normalen Verteilung der erythropoetischen Vorstufen der gemittelten Originalpräparate, nehmen die reifen Zellen bei beiden Eigenserumzusätzen (Abb. 26, 27) kontinuierlich zu. Unter Abnahme der polychromatischen Erythroblasten erhöht sich auch der Anteil der unreifen Vorstufen etwas. Dies spricht für eine gute Regenerationsfähigkeit bei gleichzeitiger Proliferation der Knochenmarkzellen. Beides ist bei Zusatz von 100% Eigenserum stärker ausgeprägt als bei 40% ES-Zusatz.

Im Gegensatz dazu zeigen beide CML-Serumzusätze innerhalb der ersten 24 Stunden eine starke Vermehrung der reifen Erythroblasten (Abb. 28), was für eine Abschwächung der Regenerationsfähigkeit spricht. Dies setzt sich bei Zusatz von 40% CML-Serum unter gleichzeitiger Abnahme der Mitosehäufigkeit bis 72 Std. fort. Dagegen zeigt sich bei Zusatz von 100% CML-Serum nach 24 Stunden eine Schwächung der Ausreifung.

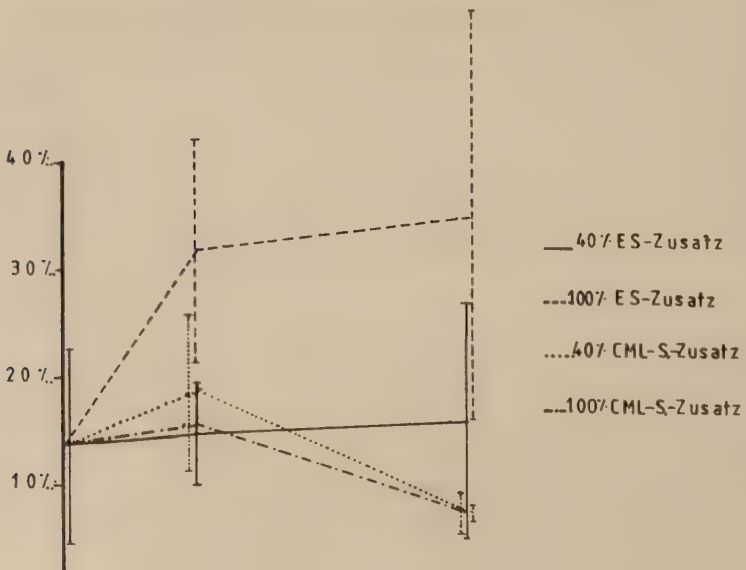
Mittelwerte der G/E - Indices (Tab. 12, S. 29)

Die gemittelten Originalpräparate zeigen einen normalen G/E - Index, der bei Zusatz von 40% ES in den ersten 24 Stunden abfällt, um bis 72 Std. wieder stark anzusteigen. Dies entspricht den Beobachtungen von Boll (14).

Mittlere Mitoseindices der Erythropoese, Versuch I - V,
n=5, Abb. 21



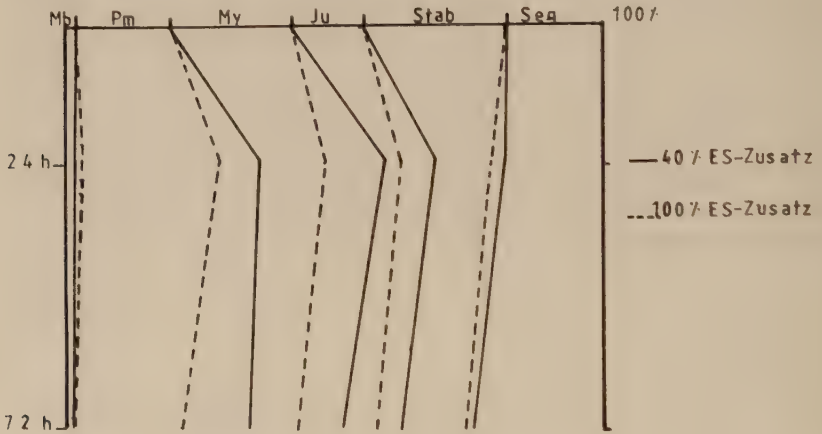
Mittlere Mitoseindices der Erythropoese, Versuch I - III,
n=3, Abb. 22



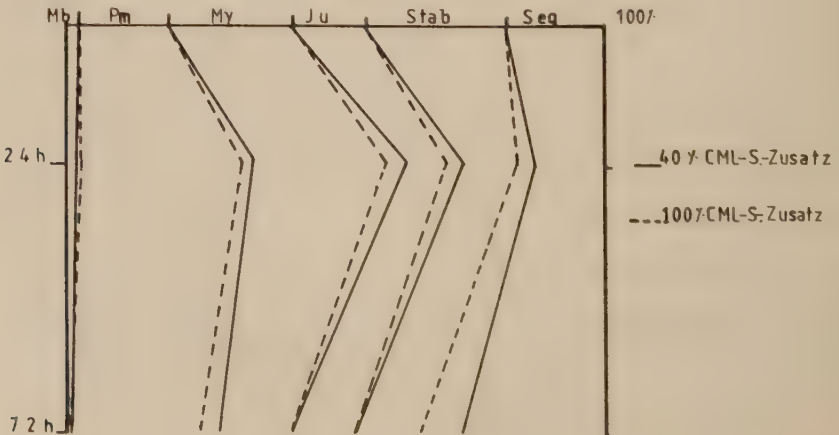
Der Zusatz von 100% ES bewirkt im Vergleich zum 40% ES-Zusatz einen signifikant stärkeren Abfall des G/E - Index bis 24 Stunden. Ebenso ist der darauffolgende Anstieg des Index bis 72 Std. signifikant höher.

Dagegen kommt es bei beiden CML-Serumzusätzen schon innerhalb der ersten 24 Std. zu einer Zunahme des G/E - Index, die sich bis 72 Std. fortsetzt. Dies beruht auf dem starken Rückgang der Erythroblasten, vor allem in der Kultur mit 100% CML-Serumzusatz. Diese Änderung des G/E - Index durch 40% bzw. 100% CML-Serumzusätze unterscheidet sich signifikant von der Wirkung beider Eigenserumzusätze auf den G/E - Index, sowohl nach 24 Std., als auch nach 72 Stunden.

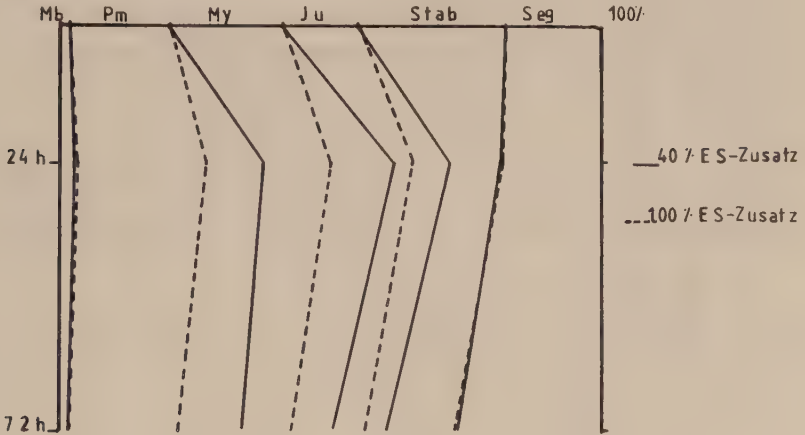
Mittelwertkurve der Reifung in der Granulopoese,
Versuch I, II, III, n=3, Abb. 23



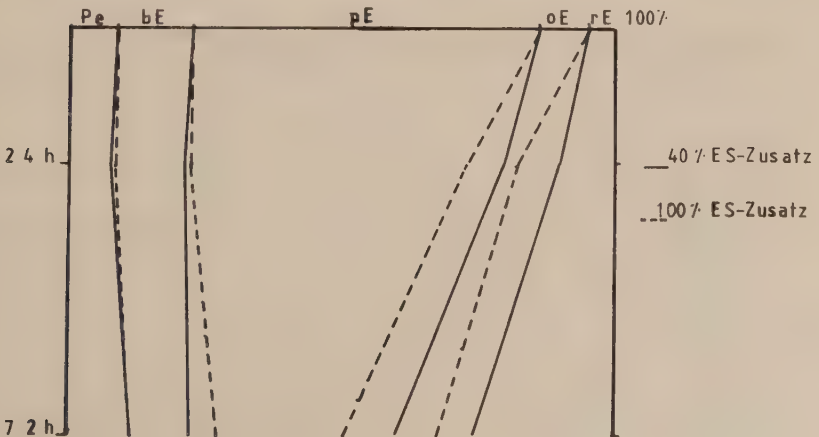
Mittelwertkurve der Reifung in der Granulopoese,
Versuch I, II, III, n=3, Abb. 24



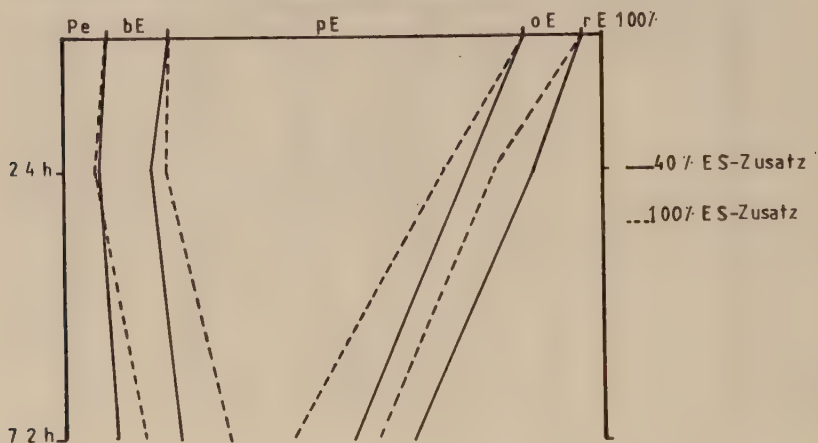
Mittelwertkurve der Reifung in der Granulopoese,
Versuch I - V, n=5, Abb. 25



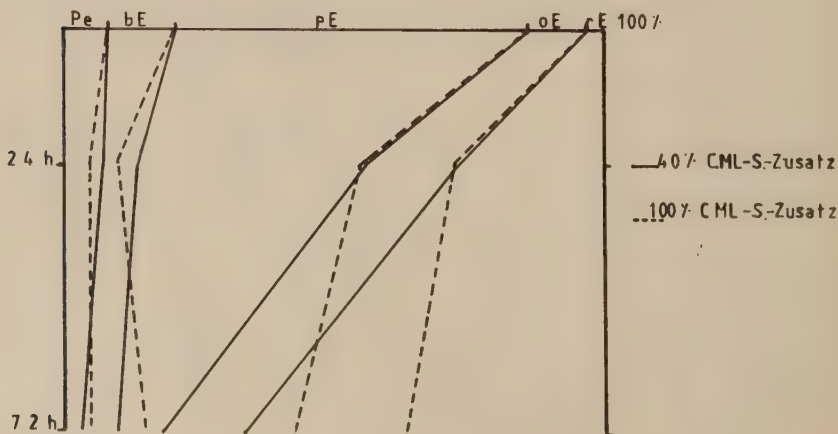
Mittelwertkurve der Reifung in der Erythropoese,
Versuch I - V, n=5, Abb. 26



Mittelwertkurve der Reifung in der Erythropoese,
Versuch I, II, III, n=3, Abb. 27



Mittelwertkurve der Reifung in der Erythropoese,
Versuch I, II, III, n=3, Abb. 28



V. Diskussion

Schon 1968 hat Boll (7, 8) in mehreren Versuchsreihen mit Koagulumkulturen festgestellt, daß es durch das Einbringen der Knochenmarkzellen in die Kultur zu einer kurzfristigen Teilungsruhe von 4-6 Stunden kommt. Dabei findet eine Teil-synchronisation der einzelnen Zellzyklen statt. Anschließend hat Boll als Ausdruck der Regeneration eine gesteigerte Mitoseaktivität beobachtet, die aber nur bis 24 Stunden anhielt, gefolgt von einem deutlichen Rückgang der Mitosehäufigkeit bis 72 Stunden. Die Koagulumkulturen wurden mit Zusatz von 90% Eigenserum stimuliert.

1975 hat Boll (14) die Proliferationskinetik menschlicher Knochenmarkzellen in Suspensionskulturen untersucht und die beiden Kulturmethoden miteinander verglichen. In den ersten 24 Stunden hat sich kein nennenswerter Unterschied in der Regenerationsfähigkeit gezeigt. In der Suspensionskultur setzt sich dann der Anstieg des Mitoseindex in der Granulopoese bis 72 Stunden fort. Auch in der Erythropoese hat Boll in der Suspensionskultur eine höhere Mitoseaktivität beobachtet, verbunden mit einer starken Zunahme des Anteils der basophilen und polychromatischen Erythroblasten. Die Suspensionskulturen wurden mit Zusatz von nur 40% Eigenserum stimuliert.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Proliferationsbedingungen für Knochenmarkzellen in Suspensionskulturen günstiger waren als in Koagulumkulturen, obgleich der Eigenserumzusatz zu den Suspensionskulturen viel geringer war.

Vergleichen wir nun Bolls Beobachtungen an Suspensionskulturen mit 40% Eigenserumzusatz mit unseren Suspensionskulturen mit gleicher ES-Zusatzkonzentration. Wir beobachteten ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme der Mitoseindices, sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese. Die Verteilung der einzelnen Reifestufen zeigt auch eine hochgradige Übereinstimmung. Die schnelle Vermehrung der reifen Granulozyten, bzw. der oxyphilen und reifen Erythroblasten, unter Erhaltung des Pools der für die Regeneration wichtigen

Promyelozyten, bzw. Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten, belegen die günstigen Proliferationsbedingungen.

Beim Vergleich unserer Ergebnisse stellen wir fest, daß die 100% Eigenserumzusätze bis 24 Stunden die Mitoserate, sowohl der Granuloblasten als auch der teilungsfähigen Erythroblasten, stärker erhöhen als die 40% ES-Zusätze. Doch unterscheidet sich die Wirkung der höher konzentrierten Eigenserumzusätze nicht signifikant von den 40% ES-Zusätzen. Nur in der Erythropoese ist der Anstieg des mittleren Mitoseindex bis 24 Std. bei Zusatz von 100% ES im Vergleich zum Zusatz von 40% ES signifikant (Tab. 8, S. 27). Daraus schließen wir, daß die Erhöhung der Konzentration des Serumzusatzes nur eine quantitative Steigerung der Stimulation der Zellteilung bewirkt.

Bis 72 Stunden fällt dann in der Granulopoese die Mitoserate der mit 100% ES-Zusatz versehenen Kulturen unter die der Kulturen mit 40% ES-Zusatz. Dagegen liegen in der Erythropoese trotz Abnahme der Mitosehäufigkeit noch höhere Werte als bei Zusatz von 40% ES vor.

Die Reifungskurven der Granulopoese und Erythropoese zeigen ebenfalls, daß der Zusatz von 100% Eigenserum eine verstärkte Regeneration und eine beschleunigte Ausreifung bewirkt.

In der angeregten Erythropoese infolge Anämie ist die Ausreifung der Erythroblasten beschleunigt, die Mitoseindices sind erhöht (Boll, 7). Dies bestätigen unsere Befunde bei Zusatz von 40% Eigenserum zu den Kulturen der Versuche IV und V. Dagegen beobachten wir bei Zusatz von 100% Eigenserum eine niedrigere Mitoserate und einen geringeren Anteil an teilungsfähigen Erythroblasten. Geht man davon aus, daß die Proliferation durch Zusatz von 100% ES stärker stimuliert wird, so könnte dies bei maximal angeregter Erythropoese eine überstürzte Ausreifung mit nachfolgender Beeinträchtigung der Regeneration bedeuten.

Da unsere 100% Eigenserumzusätze ungefähr den von Boll an Koagulumkulturen verwendeten 90% Eigenserumzusätzen ent-

sprechen, können wir die von Boll 1975 beobachteten günstigeren Proliferationsbedingungen in der Suspensionskultur bestätigen. Die Mitoseaktivität der Knochenmarkszellen bleibt in der Suspensionskultur bis 72 Stunden in gleicher Höhe erhalten. Auch die teilungsfähigen Vorstufen, als Parameter des Regenerationspotentials, bleiben bis 72 Stunden erhalten.

Die Vorteile der Methode der Suspensionskultur gegenüber der der Koagulumkultur sind also noch deutlicher erkennbar, wenn man die mit jeweils gleich hohen Konzentrationen von Eigenserumzusätzen erzielten Ergebnisse miteinander vergleicht. Das flüssige Medium scheint eher den physiologischen Bedingungen in vivo zu entsprechen, indem durch Zell zu Zell-Kontakt Stoffaustausch und Induktion ermöglicht werden (Dexter, 23), und den Zellen eine längere Überlebenszeit in vitro ermöglicht wird (Metcalf, 45).

Nun zu den CML-Serumzusätzen: Der 40% CML-Serumzusatz stimuliert die Mitoseaktivität der Granuloblasten stärker als der Eigenserumzusatz gleicher Konzentration, und annähernd so stark wie der 100% ES-Zusatz. Jedoch zeigt nur der Anstieg des weißen Mitoseindex bis 72 Stunden bei Zusatz von 40% CML-Serum im Vergleich zum 40% ES-Zusatz eine signifikante Veränderung. Die initiale Zunahme des Anteils der teilungsfähigen Granuloblasten spricht, im Zusammenhang mit der erhöhten Mitosefrequenz, für eine Steigerung der Regeneration. Die beschleunigte Ausreifung ist als Ausdruck einer Stimulierung der Differenzierung zu werten.

In der Erythropoese bewirkt der 40% CML-Serumzusatz anfangs eine Zunahme der Mitosehäufigkeit. Unter kontinuierlicher Vermehrung der reifen Erythroblasten fällt dann die Mitoserate bis 72 Std. steil ab. Der G/E - Index zeigt gleichzeitig einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu beiden ES-Zusätzen. Es tritt keine erneute Vermehrung der teilungsfähigen Erythroblasten auf. Die Ausreifung ist beschleunigt, aber die Regeneration in der Erythropoese wird durch 40% CML-Serumzusatz nicht stimuliert.

Im Gegensatz zu den Eigenserumzusätzen stimuliert der höher konzentrierte CML-Serumzusatz (100%) die Mitoserate, sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese, deutlich schwächer als der 40% CML-Serumzusatz. Seine Wirkung entspricht in etwa der des 40% ES-Zusatzes. Doch beobachten wir auch bei 100% CML-Serumzusatz, trotz niedrigerer Mitoserate, eine initiale Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten. Erst nach 72 Stunden ist der weiße Mitoseindex bei Zusatz von 100% CML-Serum höher als bei dem ES-Zusatz gleicher Konzentration, und der Ausreifungsgrad erreicht zu diesem Zeitpunkt den der Kultur mit 40% CML-Serumzusatz. Die Ausreifung ist somit ebenfalls beschleunigt.

Der rote Mitoseindex fällt auch beim höher konzentrierten CML-Serumzusatz bis 72 Stunden stark ab. Während sich aber beim 40% CML-Serumzusatz die reifen Erythroblasten stetig vermehren, tritt bei 100% CML-Serumzusatz nach 24 Stunden eine massive Hemmung der Ausreifung ein. Gleichzeitig steigt der G/E - Index sprunghaft an. Dieser Anstieg ist, sowohl im Vergleich zum 40% CML-Serumzusatz als auch im Vergleich zu beiden Eigenserumzusätzen hoch signifikant. Trotzdem ergibt die Änderung der Konzentration der CML-Serumzusätze, wie die der Eigenserumzusätze, keine Signifikanz der Unterschiede in der Stimulationswirkung (Tab. 6).

Die von anderen Autoren (17, 19, 45) beschriebene erhöhte CSA-Konzentration im Serum von an chronisch myeloischer Leukämie Erkrankten könnte die von uns beobachtete Steigerung der Regeneration und Reifung normaler Knochenmarkzellen bei Zusatz von 40% CML-Serum erklären.

Auch Lübke (39) beobachtet an Koagulumkulturen, daß der Zusatz von 90% CML-Serum zu normalen Knochenmarkzellen die Mitoserate zusätzlich erhöht und gleichzeitig eine Reifungsstimulation bewirkt.

Man kann also davon ausgehen, daß die Regulationsfaktoren im CML-Serum zumindest quantitativ im Sinne einer Wirkungssteigerung verändert sind.

Andererseits stellt Boll (8, 9) bei Versuchen mit CML-Zellkulturen fest, daß der Zusatz von normalem Serum zwar die reduzierte Mitoserate der CML-Zellkulturen normalisiert, den Proliferationsdefekt aber nicht ausgleichen kann. Metcalf (45) erklärt die Ausreifungsstörung leukämischer Zellen trotz nachgewiesener erhöhter CSA-Spiegel damit, daß die Empfindlichkeit der Zielzellen bei CML herabgesetzt ist.

Forrer (29) vermutet, daß der für die Pathogenese der Leukämie entscheidende Defekt auf der Ebene der pluripotenten Stammzelle liegt. Dies erklärt auch die Mitbeteiligung der Erythropoese.

Wir beobachten dagegen in der Erythropoese nur eine Beschleunigung der Ausreifung durch 40% CML-Serumzusatz, jedoch keine Stimulation der Regeneration. Der höher konzentrierte CML-Serumzusatz (100%) hemmt sogar die Ausreifung der Erythroblasten.

Unsere Ergebnisse bestätigen, daß der Zusatz von CML-Serum die Ausreifung und Regeneration normaler Granuloblasten stärker als der Zusatz von normalem Serum stimuliert. Bemerkenswert ist, daß mit der Erhöhung der Serumkonzentration die Stimulationswirkung des CML-Serums abnimmt, während die Stimulationswirkung des Eigenserums zunimmt. Dies könnte auf dem in der CML gestörten Gleichgewicht zwischen den die Granulopoese stimulierenden und hemmenden Faktoren beruhen, wobei in den höher konzentrierten CML-Serumzusätzen die hemmenden Faktoren überwiegen müßten. Trotzdem ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Stimulationswirkung auf die Mitoseaktivität zwischen Eigenserum- und CML-Serumzusätzen, was vermuten läßt, daß nur eine quantitativ veränderte Stimulationswirkung der Serumfaktoren in der CML auftritt.

VI. Zusammenfassung der Arbeit

Die Wirkung von autologem Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen und von Serum von CML-Patienten mit unterschiedlichen Konzentrationen auf menschliche Knochenmarkszellen in vitro während drei Kulturtagen wird untersucht. Zur Kultivierung wird die Methode der Suspensionkultur nach Boll (14) verwendet.

Es werden Sternalpunktate von fünf Patienten mit annähernd normalem Knochenmark verwendet. Von diesen Patienten werden gleichzeitig Eigenserumproben gewonnen, die den Knochenmarkkulturen jeweils in einer Konzentration von 40% und 100% zugesetzt werden. Parallel werden Kulturen mit dem gefrorenen und aufgetauten Serum von drei an chronisch myeloischer Leukämie erkrankten Patienten in gleichen Konzentrationsverhältnissen angesetzt.

Von jedem der so angesetzten fünf Versuche wird vor der Kultivierung ein Sofortausstrich als Originalpräparat gewonnen und wie die Kulturausstriche nach Pappenheim gefärbt. Nach 24 und 72 Stunden Kulturdauer werden Proben entnommen, ausgestrichen, gefärbt und differenziert. Pro Ausstrich werden 2000 Zellen differenziert, insgesamt 72910 Zellen. Daraus werden Mitoseindices und G/E - Indices bestimmt und Reifungskurven der Granulopoese und Erythropoese angefertigt.

Die Ergebnisse bestätigen, daß die Suspensionskulturmethode der Methode der Koagulumkultur überlegen ist. Dies zeigt sich sowohl in einer längeren Überlebenszeit der im flüssigen Medium kultivierten Zellen, als auch in einer größeren Proliferationsfähigkeit der Zellen.

Die höher konzentrierten Eigenserumzusätze (100%) bewirken, sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese, eine schnellere Ausreifung der Zellen als die niedrigeren ES-Zusätze (40%). Dies ist an der maximal erhöhten Mitoserate innerhalb der ersten 24 Kulturstunden und dem schnellen Rückgang der Mitosehäufigkeit bis 72 Stunden unter stetiger Vermehrung der reifen Zellen erkennbar.

Die niedrigere CML-Serumkonzentration (40%) stimuliert die

Proliferation stärker als die gleichhohe Eigenserumkonzentration und ist in ihrer Wirkung auf die Mitoserate dem höher konzentrierten Eigenserumzusatz (100%) vergleichbar. Gleichzeitig ist der Anteil der teilungsfähigen Granuloblasten als Parameter des Regenerationspotentials bei 40% CML-Serumzusatz größer als bei beiden Eigenserumzusätzen. In der Erythropoese bewirkt der 40% CML-Serumzusatz nur eine Beschleunigung der Ausreifung, aber keine Stimulierung der Regeneration.

Dagegen zeigt sich bei Zusatz von 100% CML-Serum eine abgeschwächte Stimulation der Proliferation in der Granulopoese, die auf einem Überwiegen der hemmenden Faktoren im höher konzentrierten CML-Serumzusatz beruhen könnte.

In der Erythropoese kommt es bei Zusatz von 100% CML-Serum sogar zu einer Hemmung der Ausreifung.

VII. Literaturverzeichnis

1. Begemann, H.: Klinische Hämatologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1975
2. Belitz, H.J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. In: Der Mathematikunterricht 3/60. Ernst Klett Verlag Stuttgart, 1960
3. Berthier, R.: Cellular Factors Regulating Granulopoiesis in Myeloid Leukemia. Blood Cells 3, 464, 1977
4. Böyum, A.: Regulation of Bone Marrow Cell Growth in Diffusion Chambers: The Effect of Adding Normal and Leukemic (CML) Polymorphonuclear Granulocytes. Blood 48, 373, 1976
5. Boll, I., M. Albrecht: Untersuchungen über die Einwirkung von Colchicin, arseniger Säure, Stickstofflost und Äthylurethan auf menschliches Knochenmark in vitro. Ärztliche Wochenschrift, 5. Jahrg., Heft 27, 485, 1950
6. Boll, I.: Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag Heidelberg, 1966
7. Boll, I., G. Mersch: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193, 1968
8. Boll, I., G. Mersch: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro. Blut 19, 257, 1969

9. Boll, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulopoese.
Folia haemat.: 91, 172, 1969
10. Boll, I., G. Fuchs: A Kinetic Model of Granulocytopoiesis. Exp. Cell. Res. 61, 147, 1970
11. Boll, I.: A Quantitative Kinetic Model of Human Erythropoiesis. In: Martin/Nowicki: Synthese, Struktur und Funktion des Hämoglobin, S. 9, J.F. Lehmanns Verlag München, 1971
12. Boll, I., V. Correll: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. VI. Verlaufsbeobachtung an Erythroblasten. Blut 24, 102, 1972
13. Boll, I.: Leitfaden der cytologischen Knochenmarkdiagnostik. J.F. Lehmanns Verlag München, 2, 1973
14. Boll, I.: Quantitative Bestimmung der Proliferationskinetik des menschlichen Knochenmarks während drei Kulturtagen. Blut 31, 201, 1975
15. Boll, I.: Granulozytopoese - Morphologie, Physiologie, Kinetik und Funktion. In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd II/3, Hrsg. von H. Begemann, Springer Verlag Heidelberg, 1976
16. Boll, I.: Studien zur humoralen Regulation des erythropoetischen Proliferationsspeichers beim Menschen. Klin. Wschr. 56, 187, 1978
17. Boll, I.: Serum Factors Influencing Human Granulocytopoietic Proliferation in Clot Cultures. Exp. Hemat. 7, 121, 1979

18. Bradley, T.R., M.A. Summer: The Growth of Bone Marrow Cells in Liquid Culture.
Br. J. Maemat. 23, 221, 1972
19. Broxmeyer, H.E.: Abnormal Granulocyte Feedback Regulation of Colony Forming and Colony Stimulating Activity-Producing Cells from Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. Leukemia Res. 1, 3, 1977
20. Burgess, W.A., E.M.A. Wilson, D. Metcalf: Stimulation by Human Placental Medium of Hemopoietic Colony Formation by Human Marrow Cells. Blood 49, 573, 1977
21. Chervenick, P.A., A.F. Lobuglio: Human Blood Monocytes: Stimulator of Granulocyte and Mononuclear Colony Formation in vitro. Science 178, 164 1972
22. Cline, M.J., D.W. Golde: Improved Techniques for Liquid Culture of Human and Mouse Bone Marrow. Blood 47, 369, 1976
23. Dexter, T.M.: Stimulation of Differentiation and Proliferation of Haemopoietic Cells in vitro. J. cell. Physiol. 82, 461, 1973
24. Dexter, T.M.: Conditions Controlling the Proliferation of Haemopoietic Cells in vitro. J. cell. Physiol. 91, 335, 1976
25. DiPersio, J.F.: Human Cell Lines that Elaborate Colony Stimulating Activity for the Marrow Cells of Man and Other Species. Blood 51, 507, 1978
26. Elias, I., P. Greenberg: Divergent Patterns of Marrow Cell Suspension Culture Growth in the Myeloid Leukemias: Correlation of in vitro Findings with Clinical Features. Blood 50, 263, 1977

27. Fibach, E., L. Sachs: Control of Normal Differentiation of Myeloid Leukemic Cells.
J. cell. Physiol. 86, 221, 1975
28. Fojo, S.S., Mc Wu, M.A. Cross: Purification and Characterisation of a Colony Stimulating Factor from Human Lung.
Biochemistry 17, 3109, 1978
29. Forrer, P.: Kinetik und Regulation der Granulopoese.
Klin. Wschr. 55, 247, 1977
30. Fraser, L.: Mechanism of Action of Serum Factors That Regulate Granulopoiesis In Vitro: Possible Physiologic Role of Serum-Inhibiting Activity.
Blood 53, 304, 1979
31. Geigy documenta: Wissenschaftliche Tabellen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1975
32. Golde, D.W.: Identification of the Colony-Stimulating Cell in Human Peripheral Blood.
J. clin. invest. 52, 2981, 1972
33. Golde, D.W., M.J. Cline: Growth of Human Bone Marrow in Liquid Culture.
Blood, 41, 45, 1973
34. Golde, D.W.: Production of Colony-Stimulating Factor by Malignant Leukocytes.
Blood 42, 749, 1974
35. Golde, D.W.: Chronic Myelocytic Leukemia Cell Growth and Maturation in Liquid Culture.
Cancer Res. 34, 419, 1974
36. Hossfeld, D.K.: Chronic Myelocytic Leukemia: Cytogenetic Findings and their Relations to Pathogenesis and Clinic.
Ser. Haemat., 7, 53, 1975

37. Lind, D.E.: The Non-Equivalence of Mouse and Human Marrow Culture in the Assay of Granulopoietic Stimulatory Factors.
J. cell. Physiol. 83, 35, 1974
38. Lord, B.I.: Proliferation Regulators in Haemopoietic Cell Populations.
Blood Cells 3, 121, 1977
39. Lübke: Wirkung von Seren von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie auf die Proliferation menschlichen Knochenmarks in vitro. Diss. Berlin, 1975
40. Mac Vittie, T.K., K.F. Mc Carthy: Inhibition of Granulopoiesis in Diffusin Chambers by a Granulocyte Chalone.
Exp. Hemat. 2, 182, 1974
41. Metcalf, D.: The Colony Stimulating Factor (CSF).
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 50, 547, 1972
42. Metcalf, D.: Human Leukemia: Recent Tissue Culture Studies on the Nature of Myeloid Leukemia. Br. J. Cancer 27, 191, 1973
43. Metcalf, D.: Responsiveness of Human Granulocytic Leukemic Cells to Colony-Stimulating Factor. Blood 43, 847, 1974
44. Metcalf, D.: Serum Potentiation of Granulocyte and Macrophage Colony Formation In Vitro.
Exp. Hemat. 3, 261, 1975
45. Metcalf, D.: Hemopoietic Colonies.
Springer Verlag Heidelberg, 1977
46. Metcalf, D.: Regulation of Hemopoiesis.
Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie 4, 521, 1978

47. Moberg, C.: Granulopoiesis in Chronic Myeloid Leukemia. Scand. J. Hemat. 12, 381, 1974
48. Moore, M.A.S., G. Spitzer, D. Metcalf: Monocyte Production of Colony Stimulating Factors in Familial Cyclic Neutropenia. Brit. J. Haem. 27, 47, 1974
49. Moore, M.A.S.: Agar Culture in CML and Blastic Transformation. Series Haematologica 8, 23, 1975
50. Morley, A., D. Higgs: Abnormal Differentiation of Leukemic Cells In Vitro. Cancer 33, 716, 1974
51. Okabe, T.: Establishment and Characterization of a Human Cancer Cell Line That Produces Human Colony Stimulating Factor. Cancer Res. 38, 3910, 1978
52. Olofsson, T., I. Olsson: Granulopoiesis in Chronic Myeloid Leukemia. II. Serial Cloning of Blood and Bone Marrow Cells in Agar Culture. Blood 47, 351, 1976
53. Paukovits, W.R.: Control of Granulocyte Production: Separation of Chemical Identification of a Specific Inhibitor (Chalone). Cell Tiss. Kinet. 4, 539, 1971
54. Paukovits, W.R.: Granulopoiesis-Inhibiting Factor: Demonstration and Preliminary Chemical and Biological Characterization of a Specific Polypeptide (Chalone). Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 147, 1973
55. Paukovits, W.R.: Chalone. Endogene Inhibitoren der Zellteilung? Blut 27, 217, 1973

56. Pedersen, B.: Possible Mechanisms of Pathogenesis and Acute Transformation in Chronic Myeloid Leukemia.
Series Haematologica 8, 45, 1975
57. Price, G.B.: The Isolation and Properties of Granulocyte Colony Stimulating Activities from Medium Conditioned by Human Peripheral Leukocytes.
Biochem. J. 148, 209, 1975
58. Queißer, W.: Das Knochenmark
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1978
59. Rohr, K.: Das menschliche Knochenmark
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1960
60. Rothstein, G.: Stimulation of Granulopoiesis by a Diffusible Factor in Vitro.
J. clin. invest. 50, 2004, 1971
61. Rytömaa, T.R., K. Kiviniemi: Control of Cell Production in Rat Chloroleukemia by Means of the Granulocyte Chalone.
Nature 220, 136, 1968
62. Rytömaa, T.R., K. Kiviniemi: Control of DNA Duplication in Rat Chloroleukemia by Means of the Granulocyte Chalone.
Europ. J. Cancer 4, 595, 1968
63. Sachs, L.: Control of Normal Cell Differentiation and the Phenotypic Reversion of Malignancy in Myeloid Leukemia
Nature 274, 535, 1978
64. Shadduck, R.K.: Preparation and Neutralisation Characteristics of an Anti-CSF Antibody
J. cell. Physiol. 86, 221, 1975
65. Shah, R.G.: Characterization of Colony Stimulating Activity Produced by Human Monocytes

and Phytohemagglutinin-Stimulated Leukocytes. Blood 50, 811, 1977

66. Stryckmans, P.: Regulation of Bone Marrow Myeloblast Proliferation in Chronic Myeloid Leukemia. Cancer Res. 36, 3034, 1976
67. Stryckmans, P.: Colony-Inhibiting Activity of Polymorph-nuclear Cells in Chronic Myeloid Leukemia. Blood Cells 3, 493, 1977
68. Toksöz, D.: The Regulation of Hemopoiesis in Long-term Bone Marrow Cultures. II. Stimulation and Inhibition of Stem Cell Proliferation. Blood 55, 931, 1980
69. Vogler, W.R.: Humoral Granulopoietic Inhibitors: A Review. Exp. Hemat. 3, 337, 1975

Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich
sehr herzlich für die Überlassung des Themas
und die geduldige und wertvolle Unterstützung
bei der Arbeit.

Lebenslauf

Am 30. 10. 1957 wurde ich als Tochter des Diplom-Volkswirtes Dr. rer. pol. G.-F. Hesse und seiner Ehefrau Meta, geb. Wiegmann in Göttingen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Gymnasiums legte ich 1976 in Koblenz die Reifeprüfung ab.

Im Oktober 1976 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Humanmedizin und schloß dieses Studium im April 1983 erfolgreich ab.

Am 1. 7. 1983 heiratete ich den Diplom-Bauingenieur Aderemi Amojò.

Seit Oktober 1983 arbeite ich als Ärztin am Ife University Teaching Hospital Complex, Ile-Ife, Nigeria.

Die Vorbereitungsarbeiten für meine Doktorarbeit begannen im Oktober 1980.

